

Identifizierung der Regulationselemente gewebespezifisch exprimierter Gene in transgenen Xenopoden

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

Des Fachbereiches Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der Universität-Gesamthochschule Duisburg-Essen

vorgelegt von

Kenneth Simon

aus Rheinberg

Oktober 2003

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität-Gesamthochschule Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. G.U. Ryffel

2. Gutachter: Prof. E. Winterhager

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Priv. Doz. L. Klein-Hitpass

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2003

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	I
I. Einleitung	1
1 Die Regulation der Transkription.....	1
2 Methoden zur Analyse gewebespezifischer Promotoren	3
3 <i>Xenopus laevis</i> als Modellorganismus	4
4 Die transgene Technik in <i>Xenopus laevis</i>	5
5 Die Entwicklung von Leber und Pankreas	7
6 Der pankreasspezifische Transkriptionsfaktor PDX-1.....	8
7 Das leberspezifische Albumin Gen	10
8 Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 α	11
9 Zielsetzung der Arbeit	13
II. Material und Methoden	14
1 Chemikalien, Puffer und Enzyme	15
2 Molekularbiologische Standardmethoden und Vektoren	15
2.1 Plasmide.....	15
2.2 Primer.....	21
2.3 PCR.....	21
3 Mutagenes.....	22
4 Haltung und Eiablage von <i>Xenopus laevis</i>	23
5 Herstellung transgener <i>Xenopoden</i>	23
6 Mikroskopie	24
7 Zelllinien	25
8 Zellkultur von FT02B- und HepG2-Zellen	25
9 Transfektion	25
10 Luciferaseassay	26
III. Ergebnisse	26
1 Analyse des PDX-1 Promotors in transgenen <i>Xenopus laevis</i> Embryonen.....	27
1.1 Der 4,5kb PDX-1 Promotor vermittelt eine Expression im Pankreas transgener Xenopoden	27
1.2 Eine PDX-1 Promotor Deletionsmutante zeigt keine pankreasspezifische Aktivität in transgenen Xenopoden.....	30
2 Analyse des 68kDa Albumin Promotors in transgenen <i>Xenopus</i> Embryonen	33
2.1 68kDa Albumin Promotor Fragmente vermitteln keine Expression in der Leber von transgenen Xenopoden.....	33

2.2 Ein Hybrid aus dem Maus Albumin Enhancer und proximalem 68kDa Albumin Promotor ist in der Leber transgener Xenopoden aktiv	37
3 Analyse des HNF1 α Promotors	41
3.1 Der humane HNF1 α Promotor zeigt keine Aktivität in transgenen Xenopoden	41
3.2 Analyse des HNF1 α Promotors aus <i>Xenopus laevis</i>	43
3.2.1 Lokalisierung eines regulatorischen Elements im proximalen HNF1 α Promotor.....	43
3.2.2 Eine mit MODY assoziierte Punktmutation im HNF1 α Promotor hat keinen Einfluß auf die Promotoraktivität in transgenen Xenopoden.....	51
3.2.3 Promotor Reportergen Analyse des Xenopus HNF1 α Promotors in Säugerzelllinien.....	55
IV. Diskussion	59
1 Expression transgener Reporter DNA unter Kontrolle des PDX-1 Promotors	59
2 Ein Hybrid aus dem Maus Albumin Enhancer und 68 kDa Albumin Promotor ist in der Leber transgener Xenopoden aktiv.	62
3 Expression transgener Reporter DNA unter Kontrolle des humanen HNF1 α Promotors	65
4 20bp im 3' Bereich des HNF1 α Promotors aus <i>Xenopus laevis</i> sind notwendig für seine endodermale Aktivität.....	65
5 Eine MODY3 assoziierte Mutation im TG Motiv des Xenopus HNF1 α Promotors hat keinen Einfluss auf seine Aktivität im Endoderm.....	67
6 Analyse des Xenopus HNF1 α Promotors in Säugerzelllinien	68
7 Die Bedeutung von Promotorstudien in transgenen Xenopoden.....	69
8 Zusammenfassung.....	72
V. Literatur	73

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
CAT	Cloramphenicol Transferase Gen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1, 3-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
F ₀	elterliche (parentale) Generation
G	Guanin
GFP	green fluorescent protein
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HNF	hepatocyte nuclear factor
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
Luc	Luciferase Gen
MMR	Marc's Modified Ringers
mRNA	messenger-RNA
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
REMI	restriction enzyme-mediated integration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDB	sperm dilution buffer
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAF	TBP-associated factor
TBP	TATA box binding protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
T	Thymin
U	units (Einheit für Enzymaktivität)
Vol	Volumen
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4chlor-3-indoyl-β-D-galaktopyranosid

I. Einleitung

1 Die Regulation der Transkription

Der Weg von der befruchteten Eizelle bis zu einem komplexen multizellulären Organismus ist charakterisiert durch koordinierte räumliche und zeitliche Musterbildungsprozesse, die durch zahlreiche genetische Signale gesteuert werden. Hierbei ist insbesondere die differentielle Genexpression eine notwendige Voraussetzung für die Ausbildung der verschiedenen Zelltypen. Es sind einige posttranskriptionale Regulationsmechanismen beim Prozessieren der primären Transkripte, bei dem Transport der mRNA aus dem Zellkern, der Stabilität der zytoplasmatischen mRNA, sowie bei der Translation der mRNA bekannt (Darnell, Jr., 1985). Die selektive Genexpression wird jedoch zum überwiegenden Teil auf der Ebene der Transkription reguliert.

Bei der Transkription dient die DNA als Matritze für eine DNA abhängige RNA Polymerase. Normalerweise binden verschiedene Transkriptionsfaktoren an einen Promotor im 5' Bereich des zu transkribierenden Gens. Zusammen mit diesen Transkriptionsfaktoren öffnet die RNA Polymerase die DNA Doppelhelix und bewegt sich dann in 3' - 5' Richtung auf dem kodogenen "Antisense" Strang der DNA. Dabei synthetisiert sie unter Verbrauch von Ribonukleotiden die RNA in 5' - 3' Richtung komplementär zur Basensequenz des kodogenen Strangs der DNA.

Ein eukaryotischer Promotor besteht aus einem Core Promotor, der für die Promotoraktivität zwar notwendig, normalerweise aber nicht ausreichend ist und einem weiteren "*upstream*" Promotor der eine Bindung weiterer DNA sequenzspezifischer Faktoren gestattet. Der Core Promotor enthält neben einer pyrimidinreichen Initiator Region an der Transkriptionsstartstelle, bei -25bp die TATA Box (TATAAAA), welche in einem Großteil von Protein kodierenden eukaryotischen Genen gefunden wird und als Bindestelle von TBP (TATA Box binding protein) erkannt wird (Maniatis et al., 1987; Orphanides et al., 1996). In *Drosophila* konnte in TATA Box freien Promotoren ein weiteres Element, das „*downstream promoter element*“ (DPE), identifiziert werden. DPE liegt bei +30 stromabwärts von der Transkriptionsstartstelle und stellt zusammen mit dem Initiator ein Bindemotiv für TFIID dar (Burke and Kadonaga, 1996). An den Grundpromoter binden generelle Transkriptionsfaktoren (GTF`s), TFIIA, -B, -C, -D, -E, -F und -H. Sie bilden einen stabilen Präinitiationskomplex (PIC) mit der RNA Polymerase II (Greenblatt, 1991; Saltzman and Weinmann, 1989; Novina

and Roy, 1996). Viele Promotoren enthalten darüber hinaus in der Region von -40 bis -110 eine CAAT Box und eine GC Box. Durch diese Promotorelemente kann die Aktivität des RNA Polymerase II Komplexes gesteigert werden (McKnight and Tjian, 1986; Dynan and Tjian, 1985).

Um die Spezifität der Genexpression zu gewährleisten, liegen im "upstream promoter" mehrere „upstream activating sequences“ (UAS). Die UAS beinhalten Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren und spielen eine elementare Rolle bei der Aktivierung des Promotors. Verschiedene Kombinationen von Transkriptionsfaktoren gestatten so eine spezifische Regulation der Genexpression (Ogata et al., 2003; Mitchell and Tjian, 1989).

Darüber hinaus können in den Introns des entsprechenden Gens oder in flankierenden Bereichen des Gens noch weitere regulative Elemente, sogenannte Enhancer oder Silencer existieren (Atchinsen et al., 1988; Banerji et al., 1981; Moreau et al., 1981; Ogbourne et al., 1998; Tamura et al., 1996). Enhancer aktivieren die Transkription während Silencer sie inhibieren. Zumeist werden diese Elemente durch hochorganisierte Strukturen, bestehend aus mehreren Transkriptionsfaktoren, erkannt. Häufig kommunizieren sie mit dem Promotor über Brückenproteine, wobei sie bis zu 50kb entfernt vom Promotor liegen können.

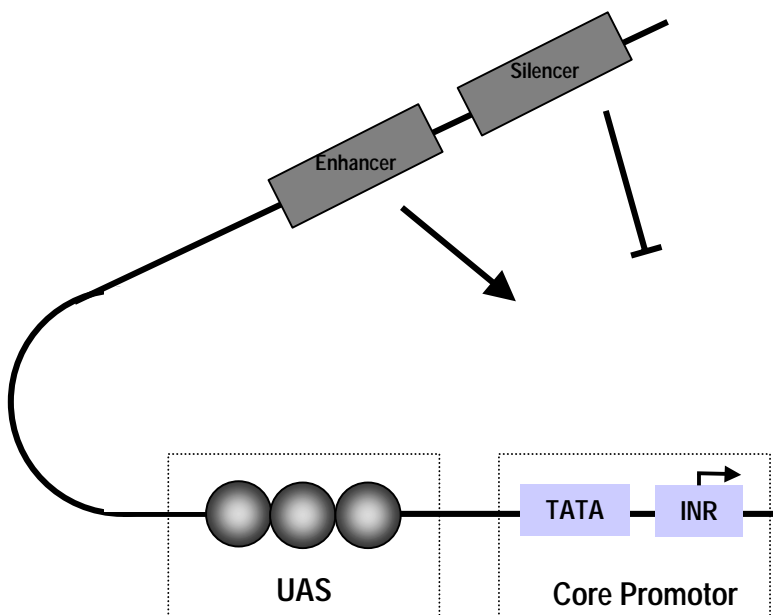


Abbildung 1: Promotor Elemente eines eukaryotischen Gens. Neben den Elementen des Core Promotor, wie die TATA Box (TATA) und das Initiator Element (INR), kontrollieren die „upstream activating sequences“ (UAS), und distale Elemente (Enhancer; Silencer) die Aktivität des Promotors.

Neben den Elementen auf der Ebene der DNA hat auch die Struktur des kompletten Genoms einen Einfluss auf die selektive Aktivierung der Transkription. In Eukaryonten ist es in einer kompakten Struktur verpackt, dem Chromatin. Grundbaustein des Chromatins ist das Nukleosom (Arents et al., 1991; Luger et al., 1997). Ein Nukleosom besteht aus einem Oktamer, in dem die Histone H3, H4, H2A und H2B doppelt vorliegen. Die DNA ist je zweimal mit einer Länge von 146bp um ein Nukleosom gewunden. Von außen an die DNA bindet das Histon H1 und sorgt für eine linkshändige Spiralisierung des Chromatins. Das Chromatin wirkt somit aufgrund seiner kompakten Struktur generell inhibierend auf die Transkription. Der Zugang zur DNA wird durch Enzyme, welche eine Verschiebung des Nukleosoms auslösen ermöglicht. Eine weitere Zugangsmöglichkeit besteht in der Modifikation von Histonen, welche eine Strukturveränderung des Chromatins einleiten (Tsukiyama and Wu, 1997; Grunstein, 1997). Durch Prozesse wie Phosphorylierung, Methylierung und Deacetylierung kann das Chromatin ebenfalls modifiziert werden (Hendzel et al., 1997; Kass et al., 1997a; Kass et al., 1997b; Taunton et al., 1996). Die Öffnung des verpackten Genoms spielt somit ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsregulation.

2 Methoden zur Analyse gewebespezifischer Promotoren

Um nun zu verstehen wie die Expression eines Gens im sich entwickelnden Organismus gesteuert wird, ist es von größter Bedeutung die Elemente zu identifizieren, welche die Aktivität des Promotors regulieren. Eine Methode zur Promotoranalyse ist die Transfektion von Promotor Reportergen Konstrukten in Zelllinien. Mit dieser Technik wurden schon viele Promotoren wie zum Beispiel der Prolactin (Telgmann and Gellersen, 1998), HNF4 (Lausen et al., 2000) und Aromatase (Zhou et al., 1997) Promotor des Menschen, oder der Vitellogenin A2 Promotor aus *Xenopus* (Klein-Hitpass et al., 1986) analysiert. Die Aktivität eines Promotors im Verlaufe der Entwicklung des Organismus kann so jedoch nicht nachvollzogen werden.

Eine erfolgsversprechendere Möglichkeit ist die Integration von Promotor Reportergen Konstrukten in das Genom eines sich entwickelnden Organismus. Dieser *in vivo* Ansatz wurde im Mausmodell bereits erfolgreich durchgeführt. So wurde für eine ganze Reihe von gewebespezifischen Promotoren wie z.B. pgam-m (Broceno et al., 1999), LH Rezeptor

(Hamalainen et al., 1999), Isulin (Dandoy-Dron et al., 1995; Dandoy-Dron et al., 1991) oder Telokin (Smith et al., 1998) gezeigt, dass sie in transgenen Mäusen eine gewebespezifische Aktivität vermitteln. Eine Identifizierung der Elemente, welche für die Gewebespezifität innerhalb des Promotors verantwortlich sind, wurde jedoch zum überwiegenden Teil nicht oder nur in Ansätzen durchgeführt. Um einen Promotor hinsichtlich seiner Gewebespezifität zu sezieren, müssen in der Regel mehrere Promotor Deletionskonstrukte in transgenen Mauslinien auf ihre gewebespezifische Aktivität untersucht werden. Die Herstellung von transgenen Linien ist jedoch nicht nur technisch recht aufwendig und zeitintensiv, sondern erfordert auch die Bereitstellung umfangreicher Räumlichkeiten für die Haltung und Züchtung der transgenen Linien. Daher lassen sich umfangreiche Promotoranalysen in transgenen Mäusen nur schwer in einem vernünftigen Kosten- und Zeitrahmen bewerkstelligen. Ein weiteres Problem ergibt sich aus der Tatsache, dass sich die Maus Embryonen innerhalb des Muttertiers entwickeln. Um die Aktivität eines Promotorkonstruktes in einem transgenen Embryo zu analysieren, muss das Muttertier getötet und die Embryonen aus ihm isoliert werden. Somit ist es praktisch unmöglich die Aktivität eines Promotors in einem transgenen Mausembryo über mehrere Entwicklungsstadien hinweg zu analysieren.

Einfacher und komfortabler lassen sich solche Studien in einem niedrigeren Vertebraten wie *Xenopus laevis* durchführen. Aufgrund der Etablierung der transgenen Technik in *Xenopus* ist *Xenopus laevis* in den letzten Jahren ein attraktiver Modellorganismus für die Analyse von Promotoren geworden und soll im Folgenden näher vorgestellt werden.

3 *Xenopus laevis* als Modellorganismus

Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* wird seit den fünfziger Jahren als Modellorganismus für entwicklungsbiologische Versuche benutzt. Ein großer Vorteil von *Xenopus* liegt in der einfachen Haltung dieser Tiere. Da sie ihr Leben ausschließlich im Wasser verbringen, können sie in mit Wasser gefüllten Aquarien gehalten werden. Als Nahrung benötigen sie kein Lebendfutter wodurch leicht eine problemlose Versorgung gewährleistet werden kann. Die Weibchen können zur Eiablage durch eine Hormoninjektion stimuliert werden. Pro Eiablage werden mehrere Tausend Eier gelegt, die aufgrund ihrer Größe und Robustheit einfach zu manipulieren sind.

Ein weiterer Vorteil ist, dass die Embryonen sich im Gegensatz zu den Mäusen oder anderen Säugetieren außerhalb des Muttertiers entwickeln. Sie benötigen kein Futter und können in einer einfachen Salzlösung gehalten werden. Da die Larven transparent sind, ist es möglich entwicklungsbiologische Vorgänge in lebenden Embryonen zu beobachten.

Xenopus laevis eignet sich als Modellorganismus für eine Vielzahl von Untersuchungsmethoden. So können durch die Injektion von DNA oder RNA in frühe Embryonalstadien einzelne Gene gezielt überexprimiert werden. Auf diese Weise lassen sich funktionelle Studien einzelner Gene im sich entwickelnden Embryo durchführen. Auf diese Weise konnten Mitglieder der TGF(transforming growth factor), FGF(fibroblast growth factor) und Wnt Protein Familien als wichtige Faktoren bei der Mesoderminduktion und der Achsenbildung identifiziert werden (Heasman, 1997). Die Genexpression wird bei der DNA Injektion durch einen Promotor zeitlich und räumlich kontrolliert. Die Aktivierung des Promotors und die dadurch ausgelöste Expression des Gens erfolgt hier mit Beginn der zygotischen Transkription im Embryonalstadium 8,5 (Yasuda and Schubiger, 1992; Nieuwkoop and Faber, 1975). Demgegenüber wird die RNA nach der Injektion umgehend translatiert. Bei beiden Methoden erfolgt die Genexpression nur transient. Sowohl die DNA, die RNA, als auch die translatierten Proteine werden im Verlaufe der Embryoentwicklung abgebaut, wodurch funktionelle Untersuchungen in späteren Entwicklungsstadien erschwert werden. Analysen der Vorgänge während der Organogenese lassen sich so nur sehr bedingt durchführen.

In diesem Zusammenhang bedeutete die von Kroll und Amaya 1996 entwickelte Methode zur Herstellung transgener Xenopoden, bei der die zu untersuchende DNA stabil in das Genom von *Xenopus* integriert wird, einen elementaren Fortschritt (Kroll and Amaya, 1996). Mit der Etablierung der transgenen Technik in *Xenopus laevis* stellt *Xenopus* ein optimales System für genetische Studien dar und eignet sich, aufgrund der hohen Zahl an Nachkommen und der einfachen Handhabung der Embryonen, insbesondere für Promotorstudien.

4 Die transgene Technik in *Xenopus laevis*

Bei der ersten publizierten Methode zur Generierung transgener Xenopoden wird eine *Xenopus* Zelllinie (X-C) mit der Ziel DNA transfiziert. Anschließend werden die Kerne isoliert und in entkernte oder nicht entkernte *Xenopus* Eier transplantiert (Kroll and Gerhart,

1994). Ein gravierender Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass mittels dieser Technik zu einem großen Teil aneuploide Embryonen erzeugt werden, die vor oder während der Neurulation sterben.

Zwei Jahre später konnte dieses Problem jedoch durch eine weiter entwickelte Technik überwunden werden. Bei dieser Methode wird die DNA vermutlich durch REMI (restriction enzyme mediated integration) stabil in das Genom von *Xenopus laevis* Spermienkernen integriert (Kroll and Amaya, 1996).

Zunächst werden aus den Hoden von *Xenopus laevis* Männchen Spermien gewonnen und aus diesen die Kerne isoliert. Die permeabilisierten Spermienkerne werden anschließend in Gegenwart von Eiextrakt und eines Restriktionsenzym mit der zu integrierenden DNA inkubiert. Dieses Spermienkern/DNA Gemisch wird in unbefruchtete *Xenopus* Eier injiziert, wobei in einen Teil der Eier jeweils ein Kern übertragen wird. Bei optimalen Bedingungen teilen sich von den injizierten Eiern 20-40%. Von diesen sich entwickelnden Embryonen tragen dann 5-40% die Ziel DNA als Transgen in ihrem Genom (Kroll and Amaya, 1996). Bis zu 35 Kopien der Ziel DNA sind hierbei an 4-8 Loci in das Genom integriert (Kroll and Amaya, 1996). Viele der mit dieser Methode generierten Embryonen entwickeln sich normal und sind auch in späteren Entwicklungsstadien bis zum adulten Frosch lebensfähig.

Mit dieser Technik konnten in *Xenopus* mit konstitutiv aktivem CMV Promotor versehene Gene, wie FGF (Kroll and Amaya, 1996), TypIII Deiodinase (D3) (Huang et al., 1999; Marsh-Armstrong et al., 1999b) oder Prolactin (Huang and Brown, 2000) überexprimiert und anhand des Phänotyps funktionell untersucht werden.

Optimal eignet sich diese Technik für die Analyse von Promotoren. Als Transgen werden Promotor Reportergen Konstrukte eingesetzt. Da diese schon in der befruchteten Eizelle in das Genom integriert werden, liegen sie später in jeder einzelnen Zelle vor. Die Expression des Reportergens kann dann an den F₀ Tieren untersucht werden. Als Reportergen eignet sich hierfür besonders GFP (green fluorescent protein), da dieses unter Fluoreszenzlicht zu beobachten ist. Somit kann die zeitliche und räumliche Aktivität eines Promotors anhand der Expression des Reportergens GFP am lebenden Embryo verfolgt werden. Als Reporter findet auch das β -Galaktosidase Gen (LacZ) Verwendung. Der Nachweis von LacZ erfolgt kolorimetrisch, indem die Embryonen mit dem Indikatorsubstrat X-Gal inkubiert werden, das von β -Galaktosidase unter Bildung eines dunkelblauen Präzipitats gespalten wird. Ein Nachteil dieses Nachweises ist jedoch, dass die Embryonen für die X-Gal Färbung fixiert werden müssen. Eine Analyse am lebenden Tier ist mit der Methode somit nicht möglich.

Mit der transgenen Technik konnte in den vergangenen Jahren bereits gezeigt werden, dass sowohl konstitutiv aktive Promotoren, wie der CMV Promotor (Ryffel and Lingott, 2000; Kroll and Amaya, 1996), als auch gewebespezifische Promotoren aus *Xenopus*, wie z.B. N- β -Tubulin, Aktin (CAR) (Kroll and Amaya, 1996; Sparrow et al., 2000), HNF1 α (Ryffel and Lingott, 2000), Xnr-1 (Hyde and Old, 2000), Bix4 (Casey et al., 1999), Xbra (Lerchner et al., 2000), γ -Crystallin (Bronchain et al., 1999; Marsh-Armstrong et al., 1999a), Rhodopsin (Knox et al., 1998) und Arrestin (Mani et al., 1999) eine räumlich und zeitlich korrekte Expression des jeweiligen Reportergens vermitteln. Auch Promotoren aus höheren Vertebraten wurden in *Xenopus* erfolgreich analysiert. So zeigten der Elastase, PDX-1 und Transthyretin Promotor aus der Maus (Beck and Slack, 1999), sowie der tubulin α -1 Promotor aus der Ratte (Marsh-Armstrong et al., 1999a) ebenfalls eine räumlich und zeitlich korrekte Aktivität. Aufgrund dieser Daten kann man spekulieren, dass wichtige Promotorelemente schon früh in der Entwicklungsgeschichte entstanden sind und sich im Laufe der Evolution kaum verändert haben.

Durch die Analyse von Promotor Deletionskonstrukten konnten Elemente im Bix4 und Xbra Promotor entdeckt werden, welche eine gewebespezifische Expression des Reportergens in der Gastrulation steuern (Casey et al., 1999; Lerchner et al., 2000). Ryffel und Lingott (2000) identifizierten Elemente im HNF1 α Promotor, welche verantwortlich für die Aktivität des HNF1 α Promotors in Pronephros, Leber und Darm sind. In dem ausschließlich im Auge aktiven Promotor Arrestin konnten ebenfalls regulatorische Regionen detektiert werden, die für die Gewebespezifität des Promotors essentiell sind (Mani et al., 1999).

Durch die Etablierung der transgenen Technik in *Xenopus laevis* ist somit ein wirkungsvolles Werkzeug für die *in vivo* Analyse von Promotoren geschaffen worden.

5 Die Entwicklung von Leber und Pankreas

Der Pankreas entwickelt sich aus dem Endoderm durch Verschmelzung einer dorsalen und ventralen Pankreasanlage. Der Pankreas setzt sich aus exocrinen Zellen, welche Enzyme in den Verdauungstrakt abgeben und endokrinen Zellen (α -, β -, δ - und PP-Zellen) welche Hormone in den Blutkreislauf abgeben zusammen. Die endokrinen Zellen gehen aus einer gemeinsamen pluripotenten Vorläuferzelle hervor, sind zunächst diffus im Gewebe verteilt

und bilden später in der Nachbarschaft zu den Gangstrukturen des Exokriniums die sogenannten Langerhansschen Inseln (Edlund, 1998; Slack, 1995). Auf molekularer Ebene wird der Beginn der Pankreasentwicklung durch die Expression der Gene Hb-9 und PDX-1 am achten Tag der Embryonalentwicklung markiert (Li et al., 1999; Harrison et al., 1999; Edlund, 1998).

Die Leber entsteht zur gleichen Zeit aus Zellen des ventralen endodermalen Epitheliums. Zunächst bildet sich eine Blase proliferierender endodermaler Zellen. Später wandern diese Zellen in das umgebende Septum Transversum des Mesenchyms und wachsen dort rasch zur Leber heran (Zaret, 2000; Wells and Melton, 1999).

Beide Organe entstehen also zur gleichen Zeit aus dem gleichen endodermalen Gewebe. Doch was reguliert diesen Prozeß? Welche Elemente in einem Promotor sind dafür verantwortlich, dass die einen Promotoren nur in sich entwickelnden Leberzellen aktiv sind, während andere Promotoren nur in Zellen des zukünftigen Pankreas aktiv sind?

Zur Beantwortung dieser Fragen bietet es sich an Promotoren von Markergenen zu untersuchen, wie es PDX-1 für den Pankreas oder Albumin für die Leber ist. Des weiteren kann man durch Analysen eines Promotors, der in beiden Geweben aktiv ist, Elemente identifizieren, die eine Expression im gesamten Endoderm vermitteln. Hierzu eignet sich insbesondere der HNF1 α Promotor. Eine Identifizierung solcher regulativen Elemente wäre von größter Bedeutung, weil mit diesem Wissen artifizielle Promotoren konstruiert werden könnten, die dann jeweils nur in den gewünschten Geweben oder Zelltypen aktiv sind. Auf lange Sicht könnte man mit diesen Erkenntnissen DNA Konstrukte verbessern, welche z.B. in der humanen Gentherapie eingesetzt werden sollen. Hier könnten artifizielle Promotoren die gewebe- oder zelltypspezifische Expression therapeutischer Gene kontrollieren.

6 Der pankreasspezifische Transkriptionsfaktor PDX-1

Der Transkriptionsfaktor PDX-1 (pancreatic duodenal homeobox gene 1), ursprünglich auch als IUF-1, IPF-1 (insulin promoter factor), IDX-1 (islet/duodenum homeobox-1), STF-1 (somatostatin transactivating factor-1) und GSF bezeichnet, wurde unabhängig voneinander in verschiedenen Laboratorien identifiziert (Ohlsson et al., 1993; Leonard et al., 1993; Guz et al., 1995; Miller et al., 1994). In *Xenopus* wurde XlHbox8, das Homolog zu PDX-1 bereits 1989 identifiziert (Wright et al., 1989).

Während PDX-1 im gesamten sich entwickelnden Pankreas exprimiert wird, ist die Expression im adulten Pankreas auf vereinzelte endokrine Zellen des Duodenums, die β -Zellen und in einem Teil der Somastatin produzierende δ -Zellen, reduziert (Guz et al., 1995). PDX-1 ist absolut notwendig für die frühe Entwicklung des Pankreas (Ahlgren et al., 1996). So wird in homozygoten $pdx-1^{-/-}$ Mäusen die Pankreasentwicklung schon sehr früh blockiert und Menschen die homozygot für einen Defekt im PDX-1 Gen sind, sind apankreatisch (Offield et al., 1996; Stoffers et al., 1997; Jonsson et al., 1994).

In der späteren Entwicklung des Pankreas führt PDX-1 zusammen mit PAX-4 (Sosa-Pineda et al., 1997) und Nkx6.1 (Jensen et al., 1996) zur Ausdifferenzierung von β -Zellen, wobei es die Expression von β zellspezifischen Genen wie Insulin, Glukokinase, Amyloid Polypeptide und Glukose Transporter Typ 2 (GLUT2) induziert (Ohlsson et al., 1993; Peshavaria et al., 1994; Watada et al., 1996a; Watada et al., 1996b; Olson et al., 1995; Peers et al., 1994; Serup et al., 1995; Bretherton-Watt et al., 1996; Carty et al., 1997).

Durch Analysen von PDX-1 Reportergen Konstrukten in transgenen Mäusen wurde zunächst eine 6,5kb große 5' flankierende Region des PDX-1 Gens aus der Ratte identifiziert, welche eine Expression im Pankreas vermittelt (Sharma et al., 1996). Kurze Zeit später wurde gezeigt, dass 4,5kb der 5' flankierende Region des PDX-1 Maus Gens ebenfalls ausreichen, um eine Aktivität im Pankreas transgener Mäuse zu vermitteln (Wu et al., 1997; Stoffers et al., 1999).

Im Promotor von PDX-1 konnten verschiedene regulatorische Elemente identifiziert werden. Eine proximale E Box, an welche das bHLH Protein USF-1 bindet wurde *in vitro* durch DNase I Protektions- sowie Gel Mobilitäts Assays identifiziert (Sharma et al., 1996). In Zellkultur Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Bindung von USF-1 an die E Box wichtig für die Aktivität des PDX-1 Promotors in β -Zellen ist (Qian et al., 1999). Mittels DNaseI und Mikrococcus Nuklease Analysen wurden drei Nuklease hypersensitive Regionen HSS1(-2560/-1880bp), HSS2(-1330/-880bp) und HSS3(-260/180bp) im PDX-1 Promotor der Maus identifiziert (Wu et al., 1997). In Zellkultur Experimenten zeigte sich, dass die HSS1 Region für Expression in den β -Zellen essentiell ist und in transgenen Mäusen vermittelte ein 1kb großes *PstI/BstEII* (-2915bp bis -1926bp) PDX-1 Promotorfragment, in dem ein großer Teil der HSS1 enthalten ist, eine Expression in den β -Zellen des Pankreas (Wu et al., 1997).

Dass die Elemente im PDX-1 Promoter, die bei Säugetieren die pankreasspezifische Expression vermitteln, stark konserviert sind, konnte durch transgene Promotor Reportergen Studien in niedrigen Vertebraten nachgewiesen werden. So vermittelt der Maus PDX-1

Promotor eine pankreasspezifische Reporter Gen Expression in transgenen Xenopoden (Beck and Slack, 1999).

7 Das leberspezifische Albumin Gen

Mitglieder der Albumin Gen Familie kodieren multifunktionale Serum Proteine, die in Hepatozyten produziert werden und als Transporter für Liganden fungieren. Sie sind somit an einer Vielzahl von metabolischen Prozessen beteiligt. Das Albumin Protein wird postnatal ausschließlich in der Leber synthetisiert und dann ins Blut sezerniert. Albumin kann verschiedene Liganden binden und diese dann übers Blut in verschiedenste Gewebe transportieren (Belanger et al., 1994).

Xenopus laevis besitzt im Gegensatz zu den meisten anderen Vertebraten zwei Albumin Gene, welche für ein 68kD und 74kD Albuminprotein kodieren. Vermutlich ist das Albumin Gen als Teil einer Genduplikation, die vor 30 Millionen Jahren stattfand, verdoppelt worden (Bisbee et al., 1977). Unterstützt wird diese These durch die Tatsache, dass *Xenopus tropicalis*, der wahrscheinlich dem diploiden Vorfahren von *Xenopus laevis* entspricht, nur ein Albumingen mit einem Molekulargewicht von 68kD besitzt (Bisbee et al., 1977; Westley and Weber, 1982; Westley and Weber, 1982; Westley et al., 1981).

In Zellkulturexperimenten zeigte eine 150bp lange 5' flankierende Sequenz des Albumin Gens aus der Maus ein leberspezifisches Expressionsprofil (Heard et al., 1987). An diesen proximalen Promotor binden diverse Proteine wie HNF1 (Hepatocyte nuclear factor 1), C/EBP (CAAT enhancer binding protein), DBP (DNA binding protein), CTF/Nf-1 verwandte Faktoren und der CAAT Faktor NF-Y (Maire et al., 1989; Gorski et al., 1986; Lichtsteiner and Schibler, 1989; Cereghini et al., 1987).

Durch Analysen in transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass bei -10kb des Maus Albumin Gens ein Enhancer (-10,5/-8,5) sitzt, der zusammen mit dem proximalen Albumin Promotor essentiell notwendig für eine leberspezifische Expression ist (Pinkert et al., 1987; Liu et al., 1991). In einem 830bp langem Core Element des Enhancers wurden insgesamt 11 Protein Bindestellen identifiziert (Liu et al., 1991). Durch *in vivo* footprinting Experimente konnte gezeigt werden, dass die Bindestellen für HNF3(FoxA) und GATA 4 in endodermalen Zellen als erstes besetzt werden und so der Bindung von anderen Faktoren an den Enhancer vorausgehen. (Cirillo et al., 1998; Bossard and Zaret, 1998; Gualdi et al., 1996).

Bei Analysen des *Xenopus laevis* 68kD Albumin Promotors konnte im proximalen Bereich neben einer TATA Box eine HNF1 Bindestelle identifiziert werden, welche für eine spezifische Expression in Leberzelllinien essentiell notwendig ist (Schorpp et al., 1988b; Schorpp et al., 1988a). Ob im weiteren „*upstream promoter*“ ebenfalls ein Enhancer vorhanden ist und ob dieser dann für die leberspezifische Expression *in vivo* notwendig ist, konnte bislang nicht überprüft werden.

8 Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 α

Ursprünglich identifiziert wurde der Transkriptionsfaktor HNF1 α durch die Analyse von Bindestellen in Promotoren leberspezifisch exprimierter Gene. HNF1 α gehört zusammen mit dem nah verwandten HNF1 β zur HNF1 (Hepatocyte Nuclear Factor-1) Protein Familie (Cereghini, 1996; Tronche and Yaniv, 1992; De, V and Cortese, 1991). Beide Faktoren zeigen die gleiche Sequenzspezifität in ihrer DNA Bindung und werden aufgrund ihrer Struktur der DNA Bindungsdomäne der Gruppe der POU Homeobox Proteine zugeordnet (Frain et al., 1989; Baumhueter et al., 1990; Rey-Campos et al., 1991; Bach et al., 1991). Zusätzlich zur Homeobox in ihrer DNA Bindedomäne besitzen beide Transkriptionsfaktoren eine POU A Domäne, welche ebenfalls an der DNA Bindung beteiligt ist. In dem N Terminus von HNF1 α und β liegt eine Dimerisationsdomäne die es den HNF1 Proteinen erlaubt, Homo- als auch Heterodimere zu bilden (Frain et al., 1989; Baumhueter et al., 1990; Chouard et al., 1990; Rey-Campos et al., 1991; De Simone et al., 1991; Ryffel, 2001; Bach et al., 1991). Die Homeodomänen von HNF1 α und β enthalten im Gegensatz zu anderen Homeodomänen einen zusätzlichen Loop von 21 Aminosäuren zwischen den hoch konservierten α -Helices 2 und 3 (Finney, 1990).

HNF1 α wurde in verschiedensten höheren und niedrigeren Vertebraten nachgewiesen und erwies sich als zwischen den Spezies stark konserviertes Protein (Bach et al., 1990; Kuo et al., 1990; Bartkowski et al., 1993; Deryckere et al., 1995; Zapp et al., 1993b). Bei Säugern konnte eine Expression von HNF1 α in Darm, Magen, Leber, Pankreas und der Niere nachgewiesen werden (Blumenfeld et al., 1991; De Simone et al., 1991; Baumhueter et al., 1990; Kuo et al., 1990; Bartkowski et al., 1993).

In *Xenopus* wird HNF1 α ebenfalls in verschiedenen Geweben endodermalen (Leber, Verdauungstrakt) und mesodermalen (Pronephros) Ursprungs exprimiert (Weber et al., 1996a; Weber et al., 1996b; Pogge v.Strandmann et al., 1997).

Es ist bekannt, dass Mutationen des humanen HNF1 α Gens im Menschen zu MODY3 (maturity onset diabetes of the young), einem autosomal dominant vererbten Insulin unabhängigen Jugenddiabetes mellitus, führen (Hattersley, 1998; Froguel and Velho, 1999; Winter et al., 1999; Winter and Silverstein, 2000; Ryffel, 2001). Neben den Mutationen im proteincodierenden Teil des HNF1 α Gens wurden in MODY3 Patienten auch Sequenzveränderungen im HNF1 α Promotor detektiert (Godart et al., 2000; Yoshiuchi et al., 1999; Gragnoli et al., 1997; Cox et al., 1999; Lehto et al., 1999). So konnte eine Veränderung in der HNF4 Bindestelle (-283A-G) bei 9 MODY3 Patienten aus 3 Generationen einer Familie gefunden werden (Gragnoli et al., 1997). Die Sequenzveränderung -119Gdel wurde bei 4 MODY3 Patienten einer Familie gefunden und ebenfalls über 3 Generationen vererbt (Yoshiuchi et al., 1999). Andere Sequenzveränderungen wurden bei 1 bis 2 MODY3 Patienten gefunden und sind weniger gut dokumentiert. Es ist unklar ob diese Sequenzveränderungen funktionsverändernde Mutationen darstellen, welche einen Einfluss auf die Aktivität des Promotors haben. Denkbar ist auch, dass es sich um Polymorphismen handelt, die im Promotor vorliegen, jedoch nicht die Aktivität beeinflussen.

In *Xenopus* wird HNF1 α mit dem Beginn der zygotischen Transkription aktiviert (Bartkowski et al., 1993; Nastos et al., 1998). Durch DNA-Injektion von HNF1 α Promotor Reportergen Konstrukten in befruchtete *Xenopus* Eier konnten vier Elemente identifiziert werden, die in die embryonale Aktivierung von HNF1 α involviert sind. Hierbei handelt es sich um ein OZ Element (Zapp et al., 1993a), welches mit dem maternalen Faktor OZ-1 interagiert (Ovsenek et al., 1992), eine Bindestelle für HNF1, HNF4 (Holewa et al., 1996) und die Transkriptionsstartstelle (Zapp et al., 1993b). HNF1 α kann über die HNF1 Bindestelle an seinen eigenen Promoter binden, was einen autoregulatorischen Mechanismus bei der Kontrolle der Expression von HNF1 α vermuten lässt. Mittels DNA Injektionen in *Xenopus* konnte für mutierte 594bp lange Promotor Reportergen Konstrukte gezeigt werden, dass für eine volle Aktivität des Promotors sowohl eine intakte HNF1 als auch HNF4 Bindestelle vorliegen müssen (Holewa et al., 1996). Da bei der DNA-Injektion in befruchtete *Xenopus* Eier das injizierte Konstrukt mosaikförmig exprimiert wird, war es mit dieser Methode nicht möglich, die einzelnen Organe zu bestimmen, welche das injizierte Konstrukt exprimieren. Eine detailliertere Analyse wurde erst durch die transgene Technik in *Xenopus* ermöglicht. Bei Promotor Reportergen Analysen in transgenen *Xenopoden* führte eine Mutation der HNF4

Bindestelle im HNF1 α Promotor zu einer Auslöschung der Reportergen Expression im Pronephros (Ryffel and Lingott, 2000). Das zeigte, dass die HNF4 Bindestelle im HNF1 α Promotor für einen aktiven HNF1 α Promoter in Geweben mesodermalen Ursprungs essentiell notwendig ist. Durch eine Deletion des 3`Bereichs bis -207bp wurde die Aktivität des HNF1 α Promotors im Endoderm der transgenen Xenopoden ausgelöscht und war auf den Pronephros beschränkt (Ryffel and Lingott, 2000). Es ist jedoch ungeklärt, welche Elemente im 3`Bereich des HNF1 α Promotors für die endodermale Aktivität von HNF1 α verantwortlich sind.

9 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen regulatorische Elemente identifiziert werden, welche die gewebespezifische Aktivität von Promotoren in transgenen *Xenopus* Embryonen steuern. Hierbei sollen Promotoren von Genen analysiert werden, welche in Organen endodermalen Ursprungs wie dem Pankreas oder der Leber exprimiert werden.

Der PDX-1 Promotor ist im sich entwickelnden Embryo ausschließlich im Pankreas aktiv. Durch Promotor Reporter Gen Analysen in transgenen Xenopoden soll die Aktivität des PDX-1 Promotors aus der Maus in *Xenopus* dokumentiert werden. Ferner soll untersucht werden, welche Bereiche im PDX-1 Promotor für eine Expression im Pankreas wichtig sind.

Das Expressionsprofil von Albumin in Vertebraten ist auf die Leber beschränkt. Durch Promotor Reporter Gen Studien in transgenen Xenopoden soll in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, welche Elemente für die leberspezifische Aktivität des Albumin Promotors essentiell notwendig sind.

Das humane HNF1 α Gen wird unter anderem in verschiedenen Organen des Endoderms exprimiert. Durch Promotor Reporter Gen Analysen soll überprüft werden, ob sich der humane HNF1 α Promotor dafür eignet, in transgenen Xenopoden hinsichtlich seiner endodermalen Aktivität analysiert zu werden.

Die Elemente im HNF1 α Promotor von *Xenopus*, welche die Aktivität des Promotors in den Geweben endodermalen Ursprungs wie der Leber und dem Pankreas steuern, sind ebenfalls noch unbekannt. In transgenen Xenopoden soll nun die für die endodermale Aktivität des HNF1 α Promotors regulatorische Region identifiziert werden. Zusätzlich soll geklärt werden, ob eine Mutation, welche im humanen HNF1 α Promotor mit MODY3 assoziiert ist, einen Einfluss auf die Aktivität des Promotors in *Xenopus* hat.

II. Material und Methoden

1 Chemikalien, Puffer und Enzyme

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Neuulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (München) bezogen. Lösungen und Puffer wurden nach Protokollen der Methodensammlung von Sambrook et al. (1989) hergestellt. Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme stammten von den Firmen Roche (Mannheim), Gibco BRL (Karlsruhe) und Pharmacia (Freiburg). Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

2 Molekularbiologische Standardmethoden und Vektoren

Molekularbiologische Techniken, wie die Anzucht und Transformation von Bakterien, Plasmid-DNA-Minipräparationen sowie die Modifikationen von DNA, wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Zur Aufreinigung der DNA nach enzymatischen Reaktionen wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (QIAGEN, Hilden) verwendet. Plasmid-DNA-Maxipräparationen erfolgten mit dem „Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen (Hilden). Sequenzierungen wurden vom Sequenzierlabor SEQLAB GmbH (Göttingen) oder vom Sequenzierservice der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen (Institut für Humangenetik, Essen) durchgeführt.

2.1 Plasmide

pCSLGFP

Der Expressionsvektor pCSGFP-2 wurde von Enrique Amaya (Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt. pCSGFP-2 exprimiert eine GFP Variante, die die Mutationen F64L und S65T enthält und im Vergleich zum Wildtyp GFP mit einer 35 mal stärkeren Signalintensität fluoresziert (Zernicka-Goetz et al., 1996; Ikawa et al., 1999). Zur Konstruktion von pCSLGFP wurde der CMV Promotor mittels *Sall/HindIII* Verdau entfernt. Anschließend wurde der Linker NotI über *Sall* und *HindIII* einkloniert. Der Linker NotI wurde durch die Hybridisierung der Oligonukleotide Linker 1 und Linker 2 hergestellt.

Vektoren für die Analyse des PDX-1 Promotors in *Xenopus laevis*:

pCSL-4,5PDX-1GFP

In diesem Expressionsvektor wird GFP unter der Kontrolle des 4,5kbPDX-1 Promotors exprimiert. Für dieses Konstrukt wurde der 4,5kbPDX-1 Promotor aus der Maus mit *NotI* und *BamHI* aus pIDX-GFP (Beck and Slack, 1999) geschnitten und in pCSLGFP über *NotI/BamHI* kloniert.

pCSL-4,5PDX-1delGFP

Ausgehend von pCS-4,5PDX-1GFP wurden durch einen *BstEII/BglII* Verdau die Promotor Sequenz von -1926bp bis -910 entfernt. Anschließend wurden die überhängenden Enden mittels Kleenow aufgefüllt und das Plasmid religiert.

Vektoren für die Analyse des Albumin Promotors in *Xenopus laevis*:

pCSL-700AlbGFP

In diesem Expressionsvektor wird GFP unter der Kontrolle des -700bp Albumin Promotorfragments exprimiert. Aus S68alb5' (Martina Schorpp unpubliziert) wurden mit den Primern XLALBFOR und XLALBRE ein 700bp großes Fragment (von

+1bp (Startcodon ATG) bis zur *HindIII* Schnittstelle bei -700bp) des Albumin Promotors mittels PCR herausamplifiziert. Gleichzeitig wurde durch XLALBRE eine *BamHI* Schnittstelle am 3'Ende des Promotorfragments eingeführt. Das PCR Produkt wurde über *HindIII/BamHI* in pCSLGFP einkloniert.

pCSL-4,2AlbGFP

GFP wird in diesem Expressionsvektor unter der Kontrolle des -4,2kb Albumin Promotors exprimiert. Aus -4200albcap (Schorpp et al., 1988) wurde ein Albumin Promotorfragment über die *HindIII* Schnittstellen bei -700bp und -4200bp mit *HindIII* ausgeschnitten und über *HindIII* in pCSL-700AlbGFP vor das -700bp Albumin Promotorfragment kloniert.

pCSLEnhancer-2kbAlbGFP

In diesem Expressionsvektor wird GFP unter der Kontrolle des Maus Albumin Enhancers fusioniert mit einem 2kb großem Fragment des 68kDa Albumin Promotors exprimiert. Das Fragment des Maus Albumin Enhancers wurde über die endogene Schnittstelle *HindIII* und *BamHI* aus pGemAlbSVPA (Yakar et al., 1999) geschnitten und in pCSLGFP über *HindIII/BamHI* vor GFP kloniert. So entstand der Vektor pCSLEnhGFP. Aus pCSL-4,2AlbGFP wurde über die bei +1 eingeführte *BamHI* Schnittstelle und eine endogene *BamHI* Schnittstelle bei ca. -2kb im Albumin Promotor, ein ca. 2kb großes Albumin Promotor Fragment durch *BamHI* ausgeschnitten. Dieses Fragment wurde anschließend in korrekter Orientierung in die *BamHI* Schnittstelle hinter den Maus Enhancer und vor GFP in pCSLEnhGFP kloniert.

pCSLEnhancer-706AlbGFP

In diesem Expressionsvektor wird GFP unter der Kontrolle des Maus Albumin Enhancers fusioniert mit dem Albumin Promotorfragment bis -706bp exprimiert. Ausgehend von pCSL-4,2AlbGFP wurden mit den Primern ALBBAM2FOR und XLALBRE 706bp des Albumin Promotors mittels PCR herausamplifiziert. Durch ALBBAM2FOR wurde eine *BamHI*

Schnittstelle bei -706bp eingeführt. Durch die zweite *BamHI* Schnittstelle (bei +1bp im Albumin Promotor) konnte das Fragment des Albumin Promotors von +1bp bis -706bp über *BamHI* in korrekter Orientierung in pCSLEnhGFP hinter den Enhancer und vor GFP eingeführt werden.

Vektor für die Analyse des humanen HNF1 α Promotors in *Xenopus laevis*:

pCShumHNF1 α GFP

Dieser Expressionsvektor wurde von Gerhart Ryffel zur Verfügung gestellt. In ihm wird GFP unter der Kontrolle des humanen HNF1 α Promotors exprimiert. Der humane HNF1 α Promotor von -87bp bis -5719bp vom Startcodon ATG wurde über *XhoI* bei -5719bp und eine, bei -87bp eingeführte *HindIII* Schnittstelle geschnitten. pCSGFP war zuvor mit *SalI* und *HindIII* geschnitten worden. Da *XhoI* und *SalI* Isoschizomere sind, konnte der *XhoI/HindIII* geschnittene humane HNF1 α Promotor über *SalI/HindIII* in pCSGFP vor das GFP kloniert werden

Vektoren für die Analyse des *Xenopus* HNF1 α Promotors in *Xenopus laevis*:

pCS-6kb/-58HNF1 α GFP

Der HNF1 α Promotor aus *Xenopus* von -5949bp bis -58bp steuert in diesem Expressionsvektor die Expression von GFP (Ryffel and Lingott, 2000)

pCS-6kb/-58HNF1 α TGGFP

In diesem Expressionsvektor wird GFP unter der Kontrolle des (-5949bp bis -58bp) HNF1 α Promotors, bei dem das Guanin an Position -95 deletiert ist, exprimiert. Ausgehend von pCS-594/-58HNF1 α GFP (Ryffel and Lingott, 2000) wurde in dem HNF1 α Promotor unter Verwendung des „QuickChangeTM Site Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene und den Primern XHNF1119DELFOW und XHNF1119DELRE ein Guanin an

Position -95 im HNF1 α Promotor deletiert. Anschließend wurde das mutierte Fragment über die endogene Schnittstelle *AvrII* (-361bp) und *HindIII* (11bp nach dem 3'Ende des HNF1 α Promotors) ausgeschnitten und in pCS-6kb/-58HNF1 α GFP kloniert.

pCS-4kb/-58HNF1 α GFP

Der Expressionsvektor pCS-4kb/-58HNF1 α GFP wurde von Gerhart Ryffel zur Verfügung gestellt. In diesem Expressionsvektor steuert der HNF1 α Promotor aus *Xenopus* von -3932bp bis -58bp die Expression von GFP.

pCS-4kb/-173HNF1 α GFP

Der Expressionsvektor pCS-4kb/-173HNF1 α GFP wurde von Gerhart Ryffel zur Verfügung gestellt. Der HNF1 α Promotor von -3932bp bis -173bp wurde in pCSGFP kloniert und kontrolliert so die Expression von GFP.

pCS-4kb/-110HNF1 α GFP

In diesem Expressionsvektor wird GFP unter der Kontrolle des HNF1 α Promotors aus *Xenopus* von -3932bp bis -110bp exprimiert. Ausgehend von pCS-594/-58HNF1 α GFP (Ryffel and Lingott, 2000) wurde durch die Primer HNF1-110RE und HNF1-110RE mittels PCR ein HNF1 α Promotorfragment herausamplifiziert und bei -110bp eine *BamHI* Schnittstelle eingefügt. Anschließend wurde das HNF1 α Promotorfragment über die endogene *AvrII* und die eingeführte *BamHI* Schnittstelle in pCS4kb/-58HNF1 α GFP kloniert.

pCS-4kb/-90HNF1 α GFP

GFP wird in diesem Expressionsvektor unter der Kontrolle des HNF1 α Promotors aus *Xenopus* von -3932bp bis -90bp exprimiert. Ausgehend von pCS-594/-58HNF1 α GFP (Ryffel and Lingott, 2000) wurde durch die Primer HNF1-85RE und HNF1-85RE mittels PCR ein HNF1 α Promotorfragment herausamplifiziert und bei -90bp eine *BamHI* Schnittstelle eingefügt. Anschließend wurde das HNF1 α Promotorfragment

über die endogene *AvrII* und die eingeführte *BamHI* Schnittstelle in pCS4kb/-58HNF1 α GFP kloniert.

Vektoren für die Analyse des Xenopus HNF1 α Promotors in Zelllinien:

<u>pGL3-594/-58HNF1α</u>	Der Expressionsvektor pGL3-594/-58HNF1 α wurde von Daniela Plitzko (IFZ Essen) zur Verfügung gestellt. In diesem Expressionsvektor wird Luciferase unter Kontrolle des -594/-58HNF1 α Promoterfragments exprimiert.
<u>pGL3-594/-90HNF1α</u>	Luciferase wird in diesem Expressionsvektor unter der Kontrolle des HNF1 α Promotors aus Xenopus von -594bp bis -90bp exprimiert. Aus pCS-4kb/-90HNF1 α GFP wurde das 3'Ende durch <i>AvrII</i> (-361bp) und <i>BamHI</i> (-90bp) ausgeschnitten und über <i>AvrII/BamHI</i> in pGL3-594/-58HNF1 α kloniert.
<u>pGL3-594/-110HNF1α</u>	In diesem Expressionsvektor wird Luciferase unter der Kontrolle des HNF1 α Promotors aus Xenopus von -594bp bis -110bp exprimiert. Aus pCS-4kb/-110HNF1 α GFP wurde das 3'Ende durch <i>AvrII</i> (-361bp) und <i>BamHI</i> (-110bp) ausgeschnitten und über <i>AvrII/BamHI</i> in pGL3-594/-58HNF1 α kloniert.
<u>pGL3-594/-128HNF1α</u>	In diesem Expressionsvektor wird Luciferase unter der Kontrolle des HNF1 α Promotors aus Xenopus von -594bp bis -128bp exprimiert. Aus pCS-4kb/-128HNF1 α GFP (Gerhart Ryffel unveröffentlicht) wurde das 3'Ende durch <i>AvrII</i> (-361bp) und <i>BamHI</i> (-128bp) ausgeschnitten und über <i>AvrII/BamHI</i> in pGL3-594/-58HNF1 α kloniert.
<u>pGL3-594/-173HNF1α</u>	In diesem Expressionsvektor wird Luciferase unter der Kontrolle des HNF1 α Promotors aus Xenopus von -594bp bis

-173bp exprimiert. Aus pCS-4kb/-173HNF1 α GFP wurde das 3'Ende durch *AvrII* (-361bp) und *BamHI* (-173bp) ausgeschnitten und über *AvrII/BamHI* in pGL3-594/-58HNF1 α kloniert.

2.2 Primer

Tabelle 1: Zusammenfassung der in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Restriktions-schnittstellen
Linker 1	TCG AGG CGG CCG CGT CGA CA	<i>NotI</i> , <i>Sall</i>
Linker 2	AGC TTG TCG ACG CCG CCG CC	<i>NotI</i> , <i>Sall</i>
XLALBFOR	GTG GGT GTT GAA TTG GGA CTG TCA	-
XLALBRE	CCA GGA TCC GAC TGG AGA TGT ATT	<i>BamHI</i>
ALBBAM2FOR	CCT AAT AGG ATC CAG CAA AGC TTT AAA AC	<i>BamHI</i> , <i>HindIII</i>
HNF1-85RE	GGT TTC AGC CAC TCA CAG CTA TTA GC	-
HNF1-110RE	CCA AAA AAA CAA GCT TTG CAG C	<i>HindIII</i>
HNF1-85RE	CTG AAG CTT CCT CCC CCC CAA AAA AAC	<i>HindIII</i>
XHNF1119DELFOW	GTT TTT TTG GGG GGA GGA GGA AAC AGA AGG	-
XHNF1119DELRE	CCT TCT GTT TCC TCC TCC CCC CAA AAA AAC	-

2.3 PCR

Bei der Klonierung der oben aufgeführten Expressionsvektoren wurden in einigen Fällen DNA Fragmente durch die „*Polymerase chain reaction*“ (PCR) amplifiziert. Hierbei wurde nach folgendem Standardprotokoll vorgegangen. Der Reaktionsansatz (siehe Tabelle 2) wurde nach dem in Tabelle 3 beschriebenen Programm inkubiert, wobei 25 bis 35 Zyklen der Schritte 2-4 gefahren wurden. Anschließend wurden 20 μ l des Ansatzes in einem Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht photographiert. Das PCR Produkt wurde aufgereinigt. Anschließend konnten die so gewonnenen DNA Fragmente für die weiteren

Klonierungsschritte verwendet werden. Alle einklonierten DNA Fragmente wurden nach abgeschlossener Klonierung zur Kontrolle sequenziert und anschließend mit der Ausgangssequenz verglichen. Somit konnte gewährleistet werden, dass nur einklonierte Fragmente ohne Sequenzveränderungen verwendet wurden. Die PCR Reaktionen wurden in dem GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer; Norwalk, USA) durchgeführt.

Tabelle 2: Reaktionsansatz für die Amplifikation von DNA Fragmenten mittels PCR

Reagenz	Volumen
DNA Template (0,01-0,001µg/µl)	10 µl
„Forward“ Primer (0.1µmol/µl)	0,5 µl
„Reverse“ Primer (0.1µmol/µl)	0,5 µl
dNTP`s (10mmol/µl)	0,5 µl
10 x PCR Puffer	5 µl
Pfu Polymerase	0,5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 3: Programm des GeneAmp PCR System 2400 für die PCR Reaktionen

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
1	94	2 min
2	94	45 sec
3	60-64	1 min
4	72	2 min
5	72	7 min
6	4	∞

3 Mutagenese

Die in dieser Arbeit verwendete Mutation im HNF1α Promotor von Xenopus wurde mit Hilfe des „QuickChangeTM Site Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene in den pCS-6kb/-58HNF1αGFP Expressionsvektor eingeführt. Dabei wurden die vom Hersteller

beschriebenen Bedingungen eingehalten. Das für die Mutagenesereaktion verwendete Primerpaar bestand aus den Primern XHNF1119DELFOW und XHNF1119DELRE. Nachdem die HNF1 α Promotorsequenz in pCS-6kb/-58HNF1 α GFP kloniert worden war, wurde sie sequenziert und überprüft. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass durch die Mutagenese zusätzliche Mutationen in das Konstrukt eingeführt worden waren.

4 Haltung und Eiablage von *Xenopus laevis*

Die *Xenopus laevis* Frösche wurde von der Fa. Xenopus (USA) bezogen. Die Frösche wurden unter Standardbedingungen (Danilchick et al., 1991) gehalten. Die Eiablage bei geschlechtsreifen Weibchen wurde durch subcutane Injektion von 600 bis 800 Einheiten des humanen Chorion-Gonadotropins (hCG) in den dorsalen Lymphsack induziert. Bezogen wurde das hCG als Pregnesin^R von der Firma Serono (Unterschleißheim). Die Kultivierung der Embryonen fand in 0,1x MMR (1 x MMR: 100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1mM MgCl₂; 2 mM CaCl₂; 5 mM HEPES, pH 7,5) bei 14 - 23 °C statt. Die Bestimmung der Entwicklungsstadien erfolgte nach Nieuwkoop and Faber (1975).

5 Herstellung transgener *Xenopoden*

Die Spermienkernpräparation wurde nach der Methode von Kroll und Amaya (1996) durchgeführt. Die Permeabilisierung der Spermien wurde jedoch nicht mit Lysolecithin sondern mit Digitonin durchgeführt (Huang et al., 1999). Die präparierten Spermienkerne wurden in Glycerolpuffer (250mM Sucrose, 15 mM HEPES (pH 7,7), 1mM EDTA, 0,5 mM Spermidin, 0,2 mM Spermin, 1 mM Dithiothreitol, 0,3 % BSA, 30 % Glycerol) aufgenommen und mit einer Konzentration von 150-200 Kerne/nl zu je 25 μ l aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurde die Konzentration der Spermienkerne erneut bestimmt und gegebenenfalls auf 100 Kerne/nl verdünnt.

Die Plasmidkonstrukte, welche als Transgen in *Xenopus* integriert werden sollten, wurden mit *NotI* verdaut und in einem Agarosegel aufgetrennt. Das *NotI* Fragment wurde anschließend aus dem Gel isoliert und in H₂O eluiert. Die so gewonnenen DNA Fragmente wurden in einer Konzentration von 0,1 µg/µl für den Reaktionsansatz verwendet. Die Herstellung transgener *Xenopus laevis* Embryonen erfolgte nach der Methode von Kroll und Amaya (1996) mit der Modifikation von Huang (1999). Zunächst werden 4 µl Spermienkerne (100Kerne/nl) mit 5 µl des Ziel DNA Fragments (0,1µg/µl) zusammenpipettiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu werden zu 25µl SDB (250mM Sucrose, 75 mM KCl, 0,5 mM Spermidin, 0,2 mM Spermin; pH 7,5) 2µl Magnesiumchlorid (100mM) und 0,5µl NotI (0,5U) gegeben. Dieser Mix wird zu dem DNA/Spermienkern Gemisch gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. 3µl des Ansatzes werden in 330µl SDB aufgenommen und dann direkt für die Injektion in unbefruchtete enthüllte *Xenopus laevis* Eier verwendet. Bei allen Pipettierschritten mit Spermienkernen wurden abgeschnittene Spitzen verwendet, da durch die größere Öffnung die empfindlichen Spermienkerne geschont werden konnten.

Die Eier wurden für die Injektion in Agaroseschalen platziert, welche zur Hälfte mit 2 % Agarose mit kleinen Vertiefungen auf der Oberfläche gefüllt waren. Die Eier lagerten sich in den Vertiefungen ab und konnten so bei dem Injektionsvorgang nicht zur Seite rutschen. Die Injektionsnadeln mit einem Durchmesser von 0,05 mm in der Spitze wurden aus 100µl Kapillaren (BLAUBRAND intraMARK; BRAND, Wertheim/Main) hergestellt. Die Injektion wurde in Gegenwart von 0,1 x MMR mit 6 % Ficoll oder 0,4 x MMR mit 6 % Ficoll durchgeführt. Im ersten Fall wurden die Eier nach der Injektion bei 14°C gehalten. Nach 24 h wurden die erfolgreich befruchteten Eier aussortiert, in 0,1 x MMR überführt und bei 18-22°C aufgezogen. Wurde die Injektion in Gegenwart von 0,4 x MMR mit 6 % Ficoll durchgeführt, wurden die Eier nach der Injektion bei 16°C gehalten und nach 4-5 Stunden in 0,1 x MMR mit 6 % Ficoll überführt. Ab dem nächsten Tag wurden die Embryonen dann in 0,1 MMR bei 18-22°C aufgezogen.

6 Mikroskopie

Die lebenden Larven wurden mit dem Leica MZ/FLIII Stereomikroskop analysiert und mit der KAPPA Kamera PS 30 C (KAPPA opto-electronics GmbH, Gleichen) photographiert. Um die Expression des grün fluoreszierenden Proteins GFP zu detektieren, wurde unter Fluoreszenzlicht ein 480/510nm Filterset verwendet. Bei Normallichtaufnahmen wurden die Larven ohne Filter photographiert. Die lebenden Larven wurden für die Dauer der Aufnahmen mit 0,01% 3-Aminobenzoessäureethylester (Sigma, München) betäubt.

7 Zelllinien

In dieser Arbeit wurde die Hepatomazelllinie FT02B aus der Ratte, sowie die humane Hepatomazelllinie HepG2 für die Transfektion von HNF1 α Promotor Reportergen Konstrukten verwendet.

8 Zellkultur von FT02B- und HepG2-Zellen

FT02B- und HepG2-Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre (95%) bei 37°C und 7,5% CO₂, in DMEM (Biochrom), mit 10% hitzeinaktivierten fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin sowie je 100 U/ml Penicillin und Streptomycin gehalten. Die Zellen wurden unter konfluenten Bedingungen gehalten.

Zur Erhaltung der Zelllinien wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden 10⁶ Zellen in 1 ml kaltem Einfriermedium (20% FCS, 10% DMSO in DMEM) aufgenommen, in 1 ml Aliquots langsam auf -70°C abgekühlt und dann über flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen der Zellen wurden die Aliquots auf 37°C erwärmt und in ein steriles Zentrifugenröhrchen mit 10 ml vorgewärmtes Medium gegeben. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und ausgesät.

9 Transfektion

HepG2- und FT02B-Zellen wurden 24h vor der Transfektion in 6-Loch Platten mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen/Loch ausgesät. 1,3 µg Plasmid-DNA wurde mit serumfreiem Medium (OPTIMEM, Invitrogen) auf 100µl verdünnt. Die 6-Loch Platten wurden mit 6 µl Lipofektamin (GIBCO, BRL) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Ein Transfektionsansatz für eine Zellkulturschale wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 1,3 ml OPTIMEM zugegeben, der Ansatz über die Zellen verteilt und Anschließend vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Hiernach wurde das Transfektionsgemisch abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde serumhaltiges Medium (DMEM³⁺) dazugegeben und die Zellen im Brutschrank inkubiert.

10 Luciferaseassay

Für den Luciferaseassay wurden die Zellen 24 Stunden nach Transfektion in 50 µl Lysepuffer aufgenommen (25 mM Trisphosphat (ph 7,8), 2 mM DTT, 2 mM CDTA, 1% Triton-X-100). Hierbei wurden die Zellen mit Hilfe eines Gummispatels von der Zellkulturschale gelöst. Die Zellen wurden abzentrifugiert und von dem Überstand wurden 20 µl mit Hilfe des „Luciferase Assay Systems“ (Promega) in einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) analysiert.

III. Ergebnisse

1 Analyse des PDX-1 Promotors in transgenen *Xenopus laevis* Embryonen

In einem Teil dieser Arbeit sollte ein im Pankreas aktiver Promotor analysiert werden. Das Ziel hierbei war die Regulationselemente zu identifizieren, welche eine Promotoraktivität im Pankreas vermitteln.

In der Maus wird das PDX-1 Gen im Pankreasgewebe des Embryos exprimiert und stellt so ein Markergen für den nicht ausdifferenzierten Pankreas dar. Aus diesem Grund ist der PDX-1 Promotor ein idealer Kandidat um die Vorgänge zu analysieren, welche zu einer Aktivierung von Genen im Pankreas führen.

1.1 Der 4,5kb PDX-1 Promotor vermittelt eine Expression im Pankreas transgener Xenopoden

Um herauszufinden welche regulatorischen Elemente in dem Promotor von PDX-1 für die pankreasspezifische Aktivität verantwortlich sind, wurde zunächst die Aktivität eines 4,5kb großen PDX-1 Promotors in transgenen Xenopoden analysiert. Hierfür wurden 4,5kb des PDX-1 Promotors aus der Maus vor das GFP in pCSLGF kloniert. Das so entstandene Promotor Reportergen Konstrukt -4,5kbPDX-1GFP wurde mittels *NotI* aus dem Vektor herausgeschnitten, isoliert und als Ziel DNA in die transgene Reaktion eingesetzt (siehe Abbildung 1). Wie in Tabelle 1 aufgeführt, konnten 4 Tiere identifiziert werden, welche sich durch eine GFP Fluoreszenz im heranwachsenden Pankreas auszeichneten. Die Augen dieser Tiere waren ebenfalls GFP positiv. Bei 4 weiteren Tieren konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop eine GFP Expression ausschließlich im Auge beobachtet werden. Diese Tiere zeigten keine GFP Fluoreszenz im Pankreas.

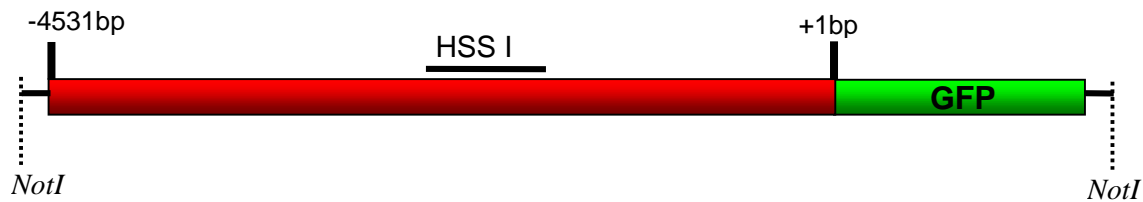


Abbildung 1: Das Promotor Reportergen Konstrukt **-4,5kbPDX-1GFP** isoliert aus pCSL-4,5kbPDX-1GFP durch Restriktion mit *NotI*. Dieses Konstrukt wurde stabil in das Genom von *Xenopus laevis* integriert. Roter Balken markiert den PDX-1 Promotor. HSS I steht für Hypersensitive Site I.

Tabelle 1: Expressionsprofil des Promotor Reportergen Konstrukts **-4,5kbPDX-1GFP** nach stabiler Integration in das Genom von *Xenopus laevis*.

Injizierte Eier	Geteilte Eier	Larven im Stadium 35	GFP Fluoreszenz im:	
			Pankreas*	Auge
8110	459	172	4	4

* waren stets auch im Auge GFP positiv

In Abbildung 2 sind zwei der Larven dargestellt, welche GFP im Pankreas exprimieren. In Bild A ist eine Larve im Stadium 22 gezeigt. Bei diesem Embryo ist bereits eine GFP Fluoreszenz im Auge zu erkennen. Auffällig ist, dass die Fluoreszenz in der Augenlinse schon vor Beginn der Pankreasentwicklung auftritt. Im Bild B kann man deutlich erkennen, wie die zwei Ausstülpungen des dorsalen und ventralen Endoderms, aus denen sich der Pankreas entwickelt, eine grüne Fluoreszenz zeigen. Diese Ausstülpungen wachsen im Verlaufe der weiteren Entwicklung zusammen. Der grün leuchtende Pankreas einer Larve im Stadium 38 ist in Bild D mit einem weißen Pfeil markiert. Im Laufe der Entwicklung wandert der Pankreas durch den Bauchraum auf die andere Seite des Rumpfes. So erkennt man den GFP positiven Pankreas in Bild E auf der Bauchseite des transgenen Embryos. Bild F zeigt den GFP exprimierenden Pankreas im Stadium 42. Der GFP positive Pankreas einer freischwimmenden transgenen Larve im Entwicklungsstadium 46 wird in Bild C gezeigt.

In den Bildern E und F der Abbildung 2 ist zusätzlich zu erkennen, dass der Bauchraum der abgebildeten Larven gelb leuchtet. Diese Fluoreszenz unterscheidet sich deutlich von dem grün leuchtenden Pankreas und ist auf die Autofluoreszenz des endodermalen Gewebes zurückzuführen.

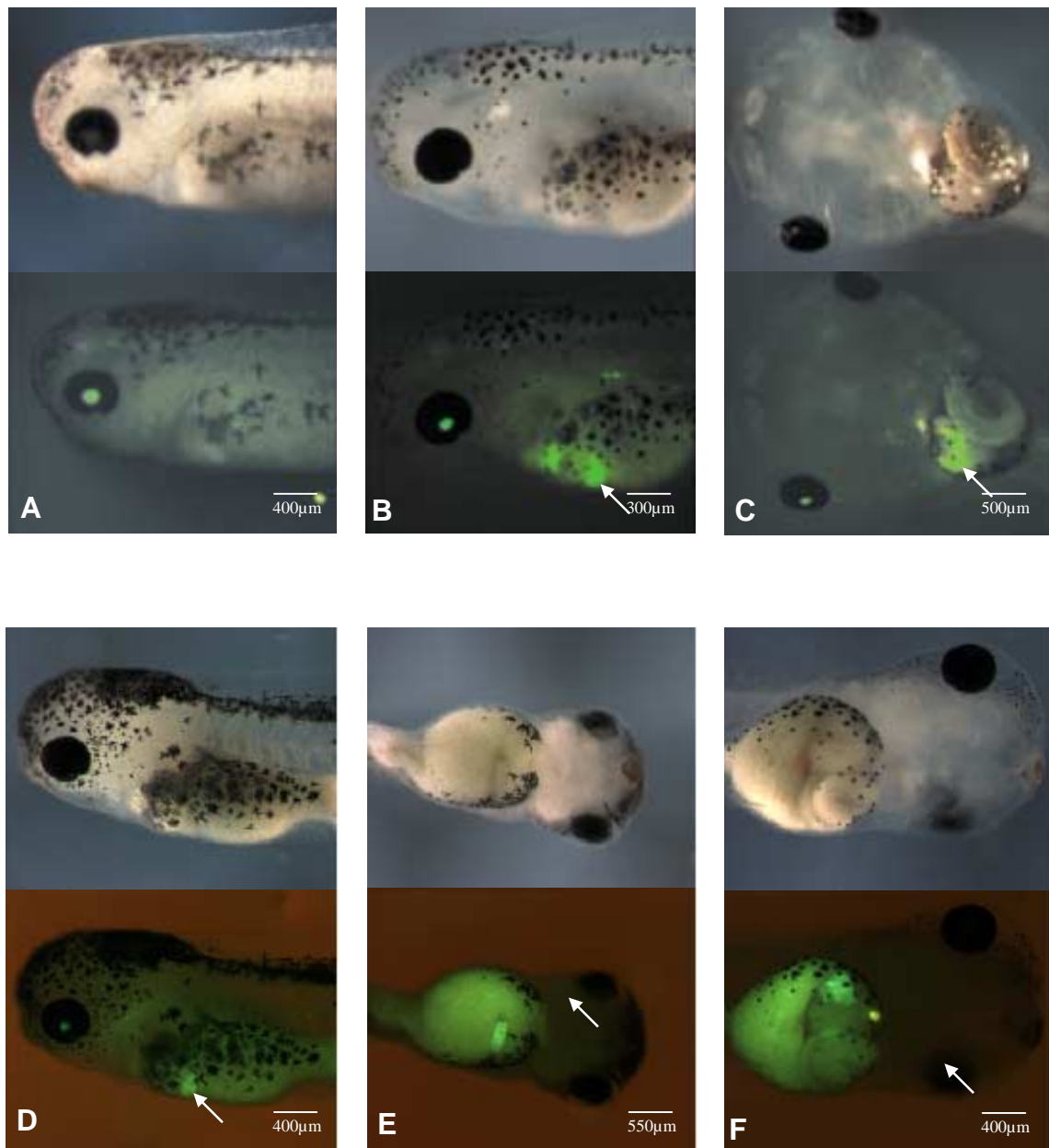


Abbildung 2: Expressionsprofil des Promotor Reportergen Konstrukts **-4,5kbPDX-1GFP** in transgenen *Xenopus laevis* Larven. Gezeigt sind zwei Larven (A-C) und (D-F) in die das Konstrukt -4,5PDX-1GFP als Transgen stabil integriert worden ist. Von Larve 1 ist die seitliche Ansicht im Stadium 22 (A) und Stadium 38 (B) gezeigt. In C ist die ventrale Ansicht derselben Larve des Stadium 46 photographiert. Von Larve 2 ist im Stadium 35 eine seitliche (D) und eine ventrale (E) Ansicht gezeigt. In F ist die Larve im Stadium 42 aus ventraler Sicht photographiert. Die oberen Photos zeigen die Larven jeweils unter Normallicht. Die unteren Abbildungen wurden unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP spezifischen Filterset aufgenommen. Die weißen Pfeile zeigen jeweils den GFP positiven Pankreas an.

1.2 Eine PDX-1 Promotor Deletionsmutante zeigt keine pankreasspezifische Aktivität in transgenen Xenopoden

Eine Möglichkeit die regulatorischen Elemente, welche die gewebespezifische Aktivität eines Promotors regulieren, zu identifizieren, besteht in der Konstruktion und Analyse von Promotor Deletionsmutanten. Bei diesem Ansatz werden Bereiche des Promotors deletiert und anschließend wird überprüft, ob das so konstruierte Promotorfragment noch in der Lage ist eine gewebespezifische Expression von Reportergenen zu vermitteln. Auf diese Weise kann der für die Gewebespezifität verantwortliche Bereich im Promotor eingegrenzt und lokalisiert werden.

Es sollte überprüft werden, ob durch eine Deletion im PDX-1 Promotor die pankreasspezifische Aktivität ausgelöscht werden kann. Hierzu wurde ein 1016bp großes Fragment aus dem PDX-1 Promotor entfernt. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, wurde bei dem so entstandenen Promotor PDX-1del die Promotorsequenz von -910bp bis -1926bp deletiert. Diese Deletion reicht somit bis in die HSSI. Das in transgenen Mäusen für eine β -zellspezifische ausreichende PstI/BstEII (-2915/-1926) Fragment ist von der Deletion jedoch nicht betroffen. Das Promotor Reportergen Konstrukt -4,5kbPDX-1delGFP wurde als Transgen in das Genom von *Xenopus* integriert.

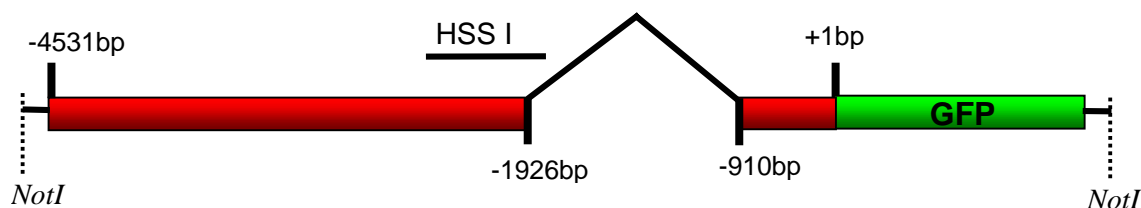


Abbildung 3: Das Promotor Reportergen Konstrukt **-4,5kbPDX-1delGFP** isoliert aus pCSL-4,5kbPDX-1delGFP durch Restriktion mit *NotI*. Dieses Konstrukt wurde stabil in das Genom von *Xenopus laevis* integriert. Der rote Balken markiert den PDX-1 Promotor mit einer Deletion von -1926bp bis -910bp dar. HSS I steht für Hypersensitive Site I von -2560/-1880.

Wie in Tabelle 2 aufgeführt wuchsen 147 Embryonen bis zur Larve des Stadiums 35 heran. Es konnte in keinem der untersuchten Tiere eine GFP Expression im sich entwickelnden Pankreas detektiert werden. 8 Tiere waren GFP positiv, wobei alle Larven eine GFP Fluoreszenz im Auge zeigten. Zusätzlich ließ sich bei 2 Tieren ein GFP positiver Pronephros beobachten.

Tabelle 2: Expressionsprofil des Promotor Reportergen Konstrukts **-4,5kbPDX-1delGFP** nach stabiler Integration in das Genom von *Xenopus laevis*.

Injizierte Eier	Geteilte Eier	Larven im Stadium 35	GFP Fluoreszenz im:		
			Pankreas	Auge	Pronephros*
2330	454	147	0	6	2

* waren stets auch im Auge GFP positiv

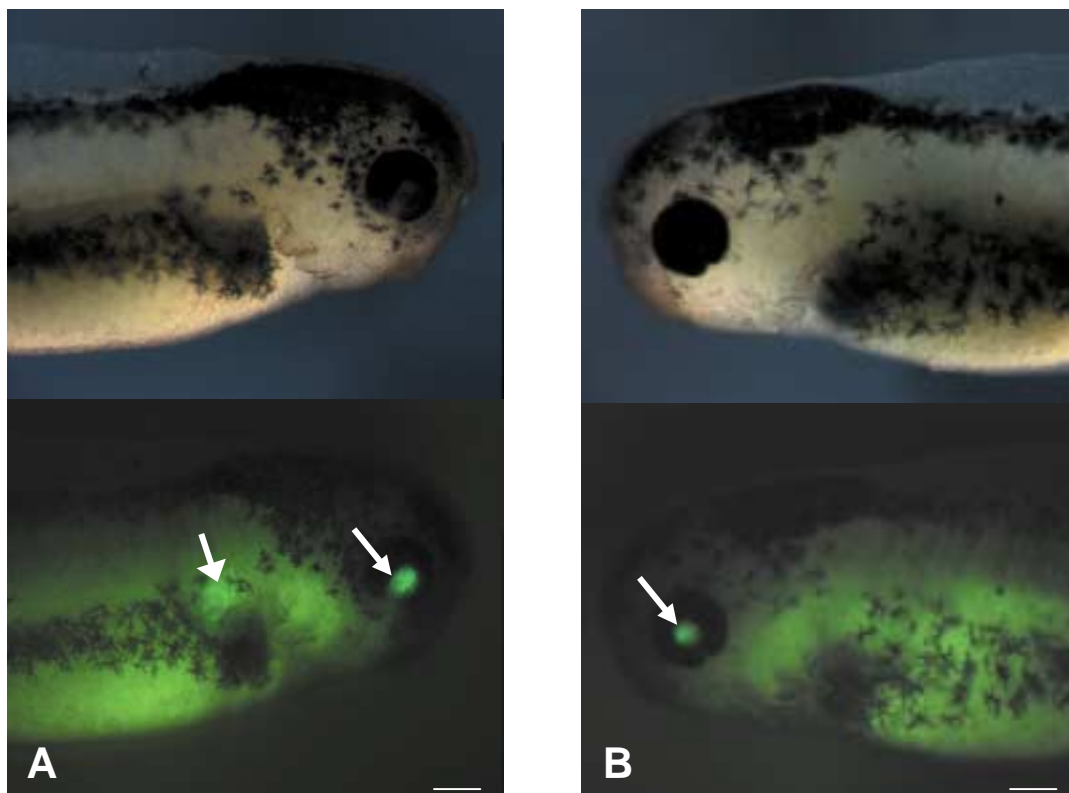


Abbildung 4: Expressionsprofil des Promotor Reportergen Konstrukts **-4,5kbPDX-1delGFP** in transgenen Larven. Gezeigt sind zwei Larven (A) und (B) in die das Konstrukt -4,5kbPDX-1delGFP als transgen stabil integriert worden ist. Die Larven wurden im Stadium 35 photographiert. Die oberen Photos zeigen die Larven jeweils unter Normallicht. Die unteren Abbildungen wurden unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP spezifischen Filterset aufgenommen. Die weißen Pfeile zeigen jeweils die GFP positiven Gewebe an. In A ist eine Larve mit GFP Fluoreszenz im Auge und im Pronephros abgebildet. B zeigt eine Larve mit einem GFP fluoreszierenden Auge.

In Abbildung 4 sind zwei Larven mit den unterschiedlichen Expressionsmustern des Promotor Reportergen Konstrukts -4,5kbPDX-1delGFP gezeigt: In A ist ein transgener Embryo im

Stadium 35 abgebildet. In der Aufnahme unter Fluoreszenzlicht ist deutlich das GFP positive Auge und der GFP positive Pronephros zu erkennen. Eine GFP Fluoreszenz im Pankreas ist hingegen nicht zu detektieren. In Bild B ist ein Embryo des Stadiums 35 zu sehen, welcher eine GFP Expression ausschließlich im Auge aufweist. Der Pankreas dieses Tieres ist ebenfalls GFP negativ.

Zusammenfassend führten die vorausgegangenen Experimente zu folgenden Ergebnissen. Der -4,5kbPDX-1 Promotor der Maus vermittelt eine Expression des Reportergens GFP im sich entwickelnden Pankreas und im Auge transgener Xenopoden. Es konnte somit erfolgreich die pankreasspezifische Aktivität des PDX-1 Promotors dokumentiert werden. Ein PDX-1 Promotor Fragment bei dem 1016 Basenpaare deletiert worden waren, zeigte eine Aktivität im Auge transgener Larven. In 2 Linien konnte zudem ein GFP positiver Pronephros beobachtet werden. Eine Expression des Reportergens GFP im Pankreas konnte jedoch nicht beobachtet werden. Somit wurde gezeigt, dass durch die Deletion die Aktivität des PDX-1 Promotors im nicht ausdifferenzierten Pankreasgewebe ausgelöscht werden konnte.

2 Analyse des 68kDa Albumin Promotors in transgenen *Xenopus* Embryonen

Im zweiten Teil der Arbeit sollte anhand eines leberspezifischen Promotors analysiert werden, welche Promotorelemente für die Expression von Genen in der Leber notwendig sind.

Albumin wird in den Hepatozyten von Vertebraten exprimiert. Die endogene Expression des 68kDa Albumin Gens in *Xenopus* Embryonen ist ausschließlich auf die Leber beschränkt. Aus diesem Grund stellt das 68kDa Albumin Gen als leberspezifisches Markergen einen idealen Kandidaten für die Identifikation von Elementen, welche eine leberspezifische Promotoraktivität regulieren, dar.

2.1 68kDa Albumin Promotor Fragmente vermitteln keine Expression in der Leber von transgenen Xenopoden

In Zellkultur Experimenten konnte für ein 700bp langes Promotor Fragment des 68kDa Albumin Promotors gezeigt werden, dass dieses in Hepatozyten aktiv ist (Schorpp et al., 1988). In Zelllinien, welche nicht aus der Leber stammen, vermittelte dieses Promotorfragment keine Expression des Reportergens. Im Zellkultur System reichte dieses Fragment somit aus, um eine leberspezifische Promotoraktivität zu erreichen.

Um zu überprüfen, ob dieser 68kDa Albumin Promotor „*in vivo*“ ebenfalls ausreicht, um eine leberspezifische Aktivität zu vermitteln, wurde ein 700bp großes Fragment des 68kDa Albumin Promotors vor das GFP in pCSL_{GFP} kloniert. Das so hergestellte und in Abbildung 5 gezeigte -700AlbGFP Konstrukt wurde mit *NotI* aus dem Plasmid herausgeschnitten, isoliert und in *Xenopus* als Transgen integriert.

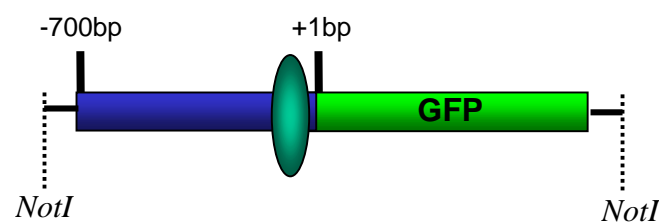


Abbildung 5: Das Promotor Reportergen Konstrukt -700AlbGFP isoliert aus pCSL-700AlbGFP durch Restriktion mit *NotI*. Dieses Konstrukt wurde stabil in das Genom von *Xenopus laevis* integriert. Der blaue Balken stellt den 68kDa Albumin Promotor von -700bp bis zum Startcodon dar. Die grüne Ellipse markiert die Bindestelle für HNF1.

Durch die Analyse von insgesamt 26 hergestellten Larven konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop festgestellt werden, dass 5 dieser Tiere GFP positiv waren (siehe Tabelle 3). Es war jedoch in keinem dieser Tiere eine leberspezifische Aktivierung von GFP zu beobachten. 2 Larven zeigten eine GFP Expression in definierten Zellen des Schwanzes, während bei 3 weiteren Larven eine unspezifische Mosaikexpression von GFP in einzelnen Zellen des Embryos auftrat.

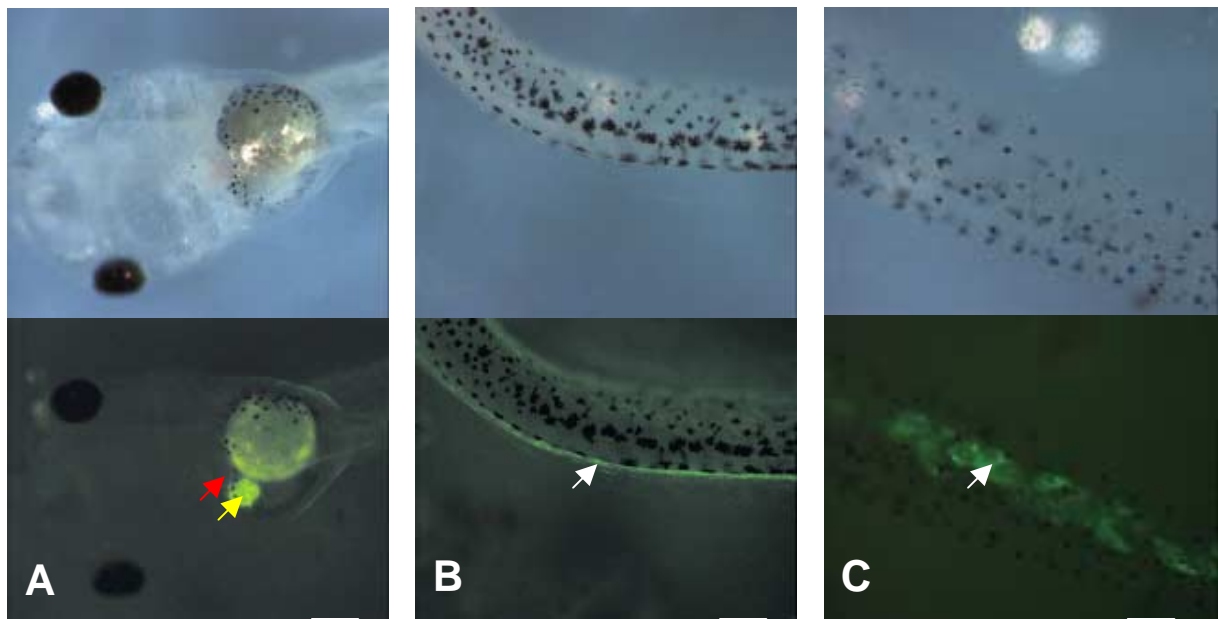


Abbildung 6: Expressionsprofil des Promotor Reportergen Konstrukts **-700albGFP** in transgenen Larven. Gezeigt sind 2 Larven, in die das Konstrukt -700albGFP als transgen stabil integriert worden ist. Die Larven wurden im Stadium 46 photographiert. Die oberen Photos zeigen die Larven jeweils unter Normallicht. Die unteren Abbildungen wurden unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP spezifischen Filterset aufgenommen. Bild A zeigt die ventrale Ansicht des Kopfes einer transgenen Larve im Stadium 46. Bild B zeigt die dorsale Ansicht des Schwanzes derselben Larve. In Bild C ist der GFP positive Schwanz einer weiteren transgenen Larve abgebildet. Die weißen Pfeile zeigen auf die GFP positiven Zellen. Der rote Pfeil zeigt auf die GFP negative Leber. Der gelbe Pfeil zeigt die autofluoreszierende Gallenblase an.

Abbildung 6 zeigt 2 transgene Larven mit einer GFP Expression in Zellen des Schwanzes. In Bild A ist der Kopf eines GFP positiven Embryos in der ventralen Ansicht gezeigt. Die Leber ist durch einen roten Pfeil markiert und GFP negativ. Die gelblich autofluoreszierende Gallenblase ist durch einen gelben Pfeil markiert. In Bild B wird der GFP positive Schwanz derselben Larve in der Aufsicht gezeigt. Die GFP positiven Zellen erstrecken sich über den ganzen Schwanz und sind auf eine genau definierte Zellregion am Flossensaum beschränkt. In Bild C ist die Seitenansicht des Schwanzes einer weiteren Larve gezeigt. In der

Fluoreszenzaufnahme kann man deutlich die mit einem weißen Pfeil markierten grünen Zellen erkennen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch ein 700bp großes Fragment des 68kDa Albumin Promotors eine Expression in transgenen Xenopoden vermittelt wird. Eine leberspezifische Expression von GFP konnte jedoch nicht dokumentiert werden. Daraus geht hervor, dass das 700bp große Fragment des 68kDa Albumin Promotors nicht ausreicht, um eine leberspezifische Promotoraktivität zu vermitteln.

Diese Ergebnisse führen zu der Frage, ob *in vivo* zusätzliche Elemente im weiteren „*upstream*“ Promotor essentiell für eine leberspezifische Promotoraktivität sind. Aus diesem Grund bietet es sich an, ein längeres Fragment des 68kDa Albumin Promotors in einem Promotor Reporter Assay hinsichtlich seines leberspezifischen Aktivierungspotentials zu überprüfen. Das längste in der Arbeitsgruppe vorliegende 68kDa Albumin Promotorfragment erstreckte sich bis -4,2kb. Es wurden somit 4,2kb des 68kDa Albumin Promotors aus *Xenopus* vor das GFP in pCSL GFP kloniert. Das so hergestellte -4,2kbAlbGFP Konstrukt, welches in Abbildung 7 zu sehen ist, wurde mit *NotI* aus dem Plasmid herausgeschnitten, isoliert und in *Xenopus* als Transgen integriert.

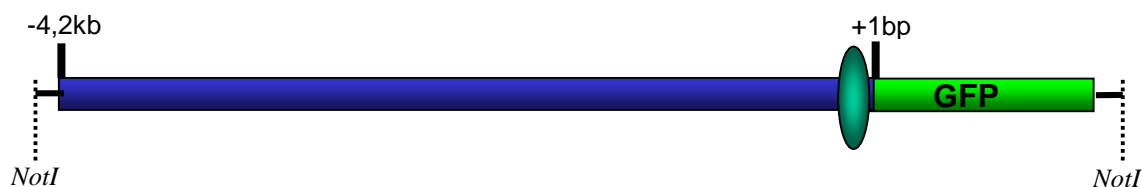


Abbildung 7: Das Promotor Reporter Assay Konstrukt **-4,2kbAlbGFP** isoliert aus pCSL-4,2kbAlbGFP durch Restriktion mit *NotI*. Dieses Konstrukt wurde stabil in das Genom von *Xenopus laevis* integriert. Der blaue Balken stellt den 68kDa Albumin Promotor von -4,2kb bis zum Startcodon dar. Die grüne Ellipse markiert die Bindestelle für HNF1.

Insgesamt wurden so 30 GFP positive Embryonen hergestellt. Eine Expression von GFP in der Leber konnte bei keinem der transgenen Xenopoden nachgewiesen werden. Während 5 Tiere eine mosaikförmige GFP Expression zeigten, ließ sich bei 12 Tieren GFP in definierten Zellen des Schwanzes nachweisen. Zusätzlich zeigten 9 der 12 Larven ein charakteristisches Expressionsmuster von GFP im Kopf. Bei 13 weiteren Tieren konnte ebenfalls ein charakteristisches Expressionsmuster von GFP in der Kopfregion nachgewiesen werden.

In Abbildung 8 sind 2 Larven abgebildet, die das Konstrukt 4,2kbAlbGFP als Transgen stabil in ihr Genom integriert haben. Bild A zeigt eine transgene Larve des Stadiums 46. Zu

erkennen sind die GFP exprimierenden Zellen im Kopf der Larve. Das Expressionsmuster von GFP hat eine netzförmige Struktur. In B ist der Kopf einer Larve aus ventraler Ansicht dargestellt. Es ist eine netzförmige Struktur GFP exprimierender Zellen zu erkennen, welche sich über die Kopfregion erstrecken. Eine Expression von GFP in der Leber ist nicht zu detektieren (roter Pfeil). In Bild C ist in einer Nahaufnahme der GFP fluoreszierende Schwanz derselben transgenen Larve gezeigt. Man sieht deutlich die GFP positiven Zellen am Flossensaum des Schwanzes (weißer Pfeil).

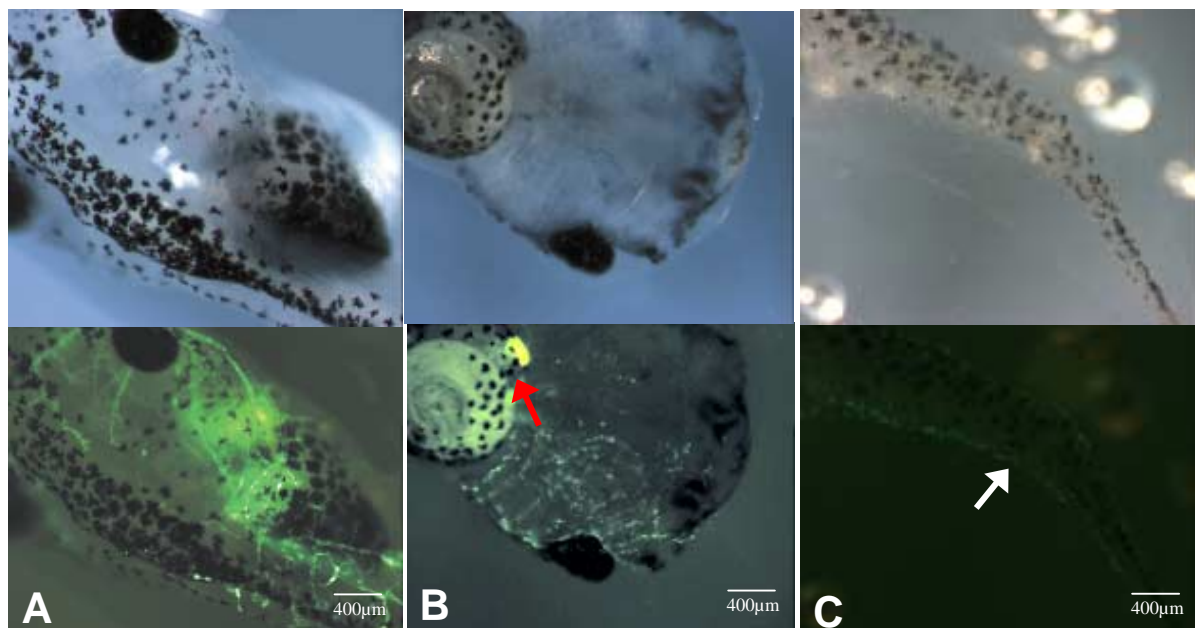


Abbildung 8: Expressionsprofil des Promotor Reportergen Konstrukts **-4,2kbAlbGFP** in transgenen Larven. Gezeigt sind 2 Larven, in die das Konstrukt -4,2kbAlbGFP als transgen stabil integriert worden ist. Die Larven wurden im Stadium 46 photographiert. Die oberen Photos zeigen die Larven jeweils unter Normallicht. Die unteren Abbildungen wurden unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP spezifischen Filterset aufgenommen. In A ist eine transgene Xenopus Larve des Stadiums 46 abgebildet. Man sieht deutlich eine netzartige GFP Fluoreszenz im Kopf der Larve. Bild B zeigt die ventrale Ansicht des Kopfes einer weiteren transgenen Larve im Stadium 46. Eine netzartige Struktur von GFP positiven Zellen ist zu erkennen. Der rote Pfeil markiert die GFP negative Leber. In Bild C ist der GFP positive Schwanz derselben transgenen Larve abgebildet. Der weiße Pfeil zeigt auf die GFP positiven Zellen am Flossensaum.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass ausgehend von einem 4,2kb langem Fragment des 68kDa Albumin Promotors eine Aktivierung des Reportergens GFP in transgenen Xenopoden ausgelöst wird. Das 4,2kb große 68kDa Albumin Promotor Fragment vermittelt eine Expression des Reportergens in definierten Zellen des Schwanzes und in der Kopfregion der Larven. Eine leberspezifische Aktivität des Promotors konnte jedoch nicht

dokumentiert werden. Dies zeigt, dass das 4,2kb lange Fragment des 68kDa Albumin Promotors nicht ausreicht, um eine leberspezifische Promotoraktivität zu vermitteln.

Tabelle 3: Expressionsprofil des Promotor Reportergen Konstrukts-**700AlbGFP** und **-4,2kbAlbGFP** nach stabiler Integration in das Genom von *Xenopus laevis*

Promotor	Injizierte Eier	Geteilte Eier	Larven im Stadium 46	GFP Fluoreszenz:		
				Leber	Zellen des Schwanzes und/oder Kopfregion	Mosaikförmig
-700Alb	2530	217	26	0	2*	3
-4,2kbAlb	8960	632	119	0	25	5

* Diese Tiere zeigten eine GFP Fluoreszenz ausschließlich in Zellen des Schwanzes

2.2 Ein Hybrid aus dem Maus Albumin Enhancer und proximalem 68kDa Albumin Promotor ist in der Leber transgener Xenopoden aktiv

Die Tatsache, dass verschieden lange Promotorfragmente des 68kDa Albumin Promotors keine Aktivität in der Leber von *Xenopus* zeigen, lassen vermuten, dass für die leberspezifische Aktivität des 68kDa Albumin Promotors *in vivo* zusätzliche Elemente benötigt werden, welche nicht in der unmittelbaren Promotorregion liegen.

Aus Untersuchungen des Maus Albumin Promotors in transgenen Mäusen geht hervor, dass bei -10kb des Maus Albumin Gens ein Enhancer (-10,5/-8,5) sitzt, welcher essentiell für eine leberspezifische Promotoraktivität *in vivo* ist. Für den *Xenopus* 68kDa Albumin Promotor ist ein solcher Enhancer bislang nicht beschrieben worden. Es sollte nun überprüft werden, ob sich durch Fusion des Maus Enhancers mit dem 68kDa Albumin Promotor eine leberspezifische Expression in transgenem *Xenopus* vermitteln lässt.

Hierfür wurde ein *HindIII/BamHI* Fragment des Maus Albumin Enhancers vor ein 2kb langes 68kDa Albumin Promotorfragment kloniert. Das so entstandene Enh-2kbAlbGFP Konstrukt

ist in Abbildung 9 dargestellt. Über *NotI* wurde das Konstrukt aus dem Plasmid herausgeschnitten, isoliert und in die transgene Reaktion eingesetzt.

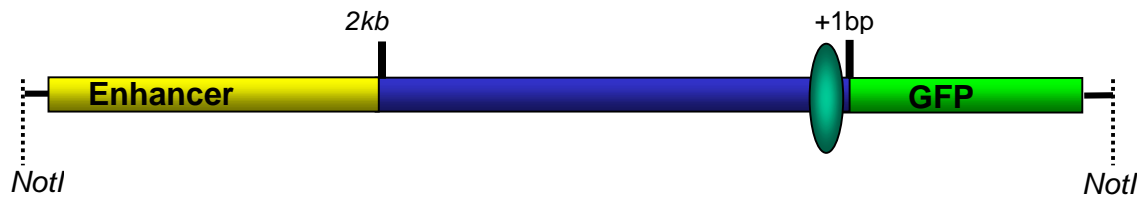


Abbildung 9: Das Promotor Reportergen Konstrukt **Enh-2kbAlbGFP** isoliert aus pCS-2kbAlbGFP durch Restriktion mit *NotI*. Dieses Konstrukt wurde stabil in das Genom von *Xenopus laevis* integriert. Der blaue Balken stellt den 68kDA Albumin Promotor von -2kb bis zum Startcodon dar. Die grüne Ellipse markiert die Bindestelle für HNF1.

Wie in Tabelle 4 zu sehen ist, wurden mit diesem Ansatz insgesamt 129 freischwimmende Larven des Stadiums 46 hergestellt. Unter diesen 129 Tieren befand sich jedoch kein einziges Tier mit einer detektierbaren GFP Expression. Alle Larven waren sowohl in der Leber als auch im restlichen Körper GFP negativ. Es konnte somit für dieses Promotorkonstrukt weder eine leberspezifische noch eine artifizielle Aktivität beobachtet werden.

Tabelle 4: Die Promotor Reportergen Konstrukte **Enh-2kbAlbGFP** und **Enh-706AlbGFP** nach stabiler Integration in das Genom von *Xenopus laevis*.

Promotor	Injizierte Eier	Befruchtete Eier	Larven im Stadium 46	GFP Fluoreszenz:	
				Leber	Mosaikförmig
Enh-2kbAlb	2870	524	129	0	0
Enh-706Alb	2600	316	67	4	2

Bei Transfektionsexperimenten von Zelllinien konnte beobachtet werden, dass längere 68kDa Albumin Promotorfragmente in Hepatozyten nur eine geringere Aktivierung von Reportergen auslösen (Schorpp et al., 1988). Aus diesem Grund sollte in einem weiteren Schritt versucht werden, durch ein kürzeres Promotorfragment, fusioniert mit dem Maus Albumin Enhancer, eine leberspezifische Promotoraktivität im transgenen Organismus zu konstruieren.

Hierzu klonierte man den Enhancer direkt an ein kurzes 68kDa Albumin Promotorfragment. Das so entstandene Enh-706AlbGFP Konstrukt ist in Abbildung 10 dargestellt. Das Konstrukt wurde über *NotI* aus dem Plasmid herausgeschnitten, isoliert und in die transgene Reaktion eingesetzt.

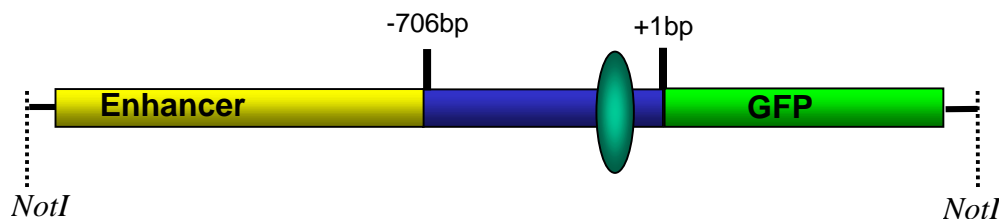


Abbildung 10: Das Promotor Reportergen Konstrukt **Enh-706AlbGFP** isoliert aus pCSEnh-706AlbGFP durch Restriktion mit *NotI*. Dieses Konstrukt wurde stabil in das Genom von *Xenopus laevis* integriert. Der blaue Balken stellt den 68kDa Albumin Promotor von -706bp bis zum Startcodon dar. Die grüne Ellipse markiert die Bindestelle für HNF1.

Mit diesem Konstrukt konnten insgesamt 6 Tiere mit einer Expression von GFP identifiziert werden. Bei 4 *Xenopus* Larven konnte eine GFP Fluoreszenz ausschließlich in der Leber nachgewiesen werden (Tabelle 4). Eine Expression in der Kopfregion oder definierten Zellen des Schwanzes war bei keinem dieser Tiere zu beobachten. Bei 2 weiteren Tieren waren vereinzelte Zellen GFP positiv.

In Abbildung 11 sind 2 Larven gezeigt, welche GFP unter der Kontrolle von Enh-706Alb exprimieren. In Bild A ist die ventrale Ansicht des Larvenrumpfes gezeigt. Die mit einem weißen Pfeil markierte Region stellt die grün fluoreszierende Leber dar. In Bild B ist eine Nahaufnahme der Bauchregion derselben Larve gezeigt. Man erkennt die GFP positive Leber, welche sich direkt neben der gelb autofluoreszierenden Gallenblase befindet. Da in diesen Stadien die Pigmentierung der Embryonen relativ weit fortgeschritten ist, sind die inneren Organe nicht mehr optimal unter der Fluoreszenzmikroskop zu erkennen. Aus diesem Grunde wurden bei einigen Larven die inneren Organe aus dem Bauchraum entfernt und isoliert analysiert. Bild C zeigt diese isolierten inneren Organe einer weiteren transgenen Larve. Auf dem oberen Durchlichtphoto erkennt man das Lebergewebe, welches sich durch seine starke Pigmentierung von der transparenten Gallenblase und dem weißlichen Magen und Pankreasgewebe abhebt. Unter Fluoreszenzlicht ist in C das durch einen Pfeil markierte grün fluoreszierende Lebergewebe zu erkennen.

Somit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass ein Hybrid aus Maus Albumin Enhancer und proximalen Albumin Promotor eine leberspezifische Expression in transgenen Xenopoden vermittelt.

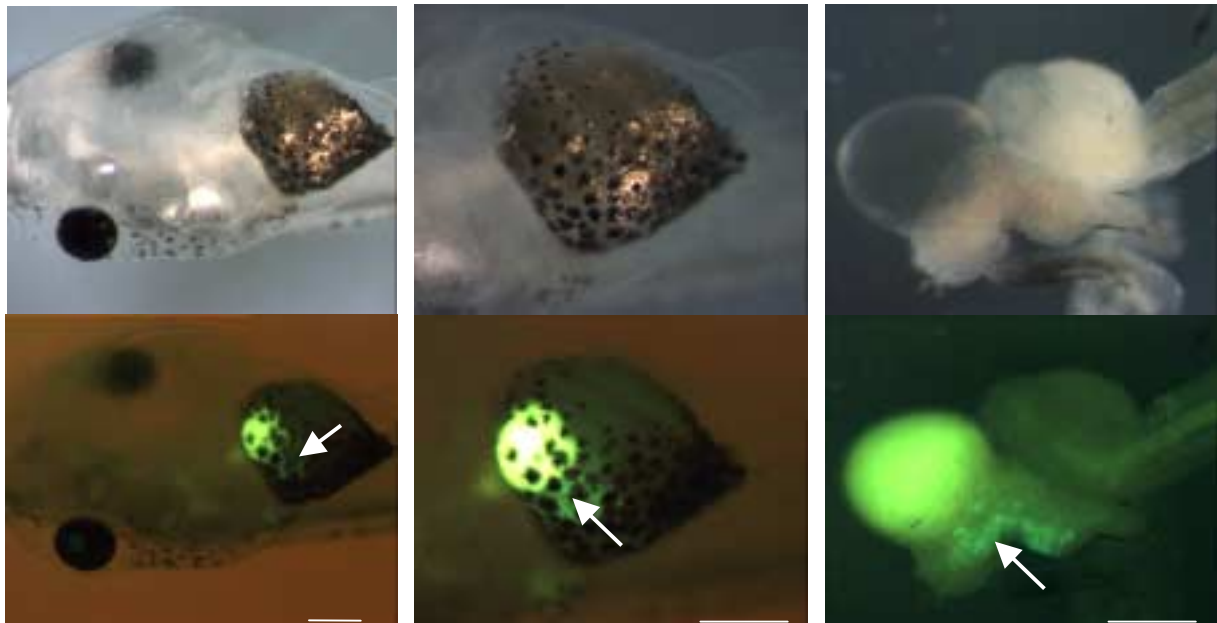


Abbildung 11: Expressionsprofil des Promotor Reportergen Konstruktes **Enh-706AlbGFP** in transgenen Larven. Gezeigt sind zwei Larven, in die das Konstrukt Enh-706AlbGFP als transgen stabil integriert worden ist. Die Larven wurden im Stadium 46 photographiert. Die oberen Photos zeigen die Larven jeweils unter Normallicht. Die unteren Abbildungen wurden unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP spezifischen Filterset aufgenommen. In A ist der Kopf einer transgene Larve im Stadium 46 gezeigt. Abbildung B zeigt die ventrale Nahaufnahme des Rumpfes derselben transgenen Larve. In C wurde eine weitere Larve aufgerissen die inneren Organe herausgenommen und isoliert photographiert. Die weißen Pfeile markieren jeweils die grün fluoreszierende Leber.

3 Analyse des HNF1 α Promotors

Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt, entstehen der Pankreas und die Leber im sich entwickelnden Embryo aus dem gleichen Vorläufergewebe, dem Endoderm. Im bisherigen Teil der vorliegenden Dissertation wurden die Promotoren pankreasspezifischer oder leberspezifischer Gene analysiert.

Der folgende Abschnitt soll sich mit der Frage beschäftigen, welche Regulationselemente für eine Promotoraktivität im gesamten Endoderm verantwortlich sind. Hierfür bietet es sich an, einen Promotor zu analysieren, welcher in verschiedenen Organen endodermalen Ursprungs aktiv ist.

Es wurde gezeigt das HNF1 α in den aus dem Endoderm entstehenden Organen wie Leber, Pankreas und Darm exprimiert wird (Blumenfeld et al., 1991; De Simone et al., 1991; Baumhueter et al., 1990; Kuo et al., 1990; Bartkowski et al., 1993). Aus diesem Grund stellt der HNF1 α Promotor einen idealen Kandidaten dar, um die Elemente zu identifizieren, welche eine Promotoraktivität im Endoderm kontrollieren.

3.1 Der humane HNF1 α Promotor zeigt keine Aktivität in transgenen Xenopoden

Die Promotor Elemente, welche die gewebespezifische Expression eines Gens regulieren, sind häufig zwischen den Spezies stark konserviert. Da das humane HNF1 α sowohl in der Struktur des Proteins als auch im Expressionsmuster eine große Übereinstimmung zu HNF1 α aus *Xenopus* zeigt, liegt die Vermutung nahe, dass auch die Kontrolle der Expression in identischer Weise reguliert wird. Zu Beginn der vorliegenden Dissertation war bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt worden, dass gewebespezifische Promotoren aus Säugetieren wie der Elastase, PDX-1 und Transthyretin Promotor aus der Maus sowie der tubulin α -1 Promotor aus der Ratte in der niedrigen Vertebraten Spezies *Xenopus laevis* eine räumlich und zeitlich korrekte Aktivität aufweisen (Beck and Slack, 1999; Marsh-Armstrong et al., 1999). Somit schien es ein vielversprechender Ansatz zu sein, den humanen HNF1 α Promotor hinsichtlich seiner endodermalen Aktivität in transgenen Xenopoden zu untersuchen.

Für den *Xenopus* HNF1 α Promotor war bereits beschrieben worden, dass 6kb des 5' Bereiches ausreichen, um eine spezifische Promotoraktivität in transgenen *Xenopoden* zu vermitteln (Ryffel and Lingott, 2000d).

Aus diesem Grund wurde ein 6kb großes Fragment des humanen HNF1 α Promotors vor das Reportergen GFP kloniert (siehe Abbildung 12). Das so hergestellte Promotor Reportergen Konstrukt pCShumHNF1 α GFP wurde zur Generierung transgener *Xenopus laevis* Larven mit *NotI* linearisiert und mit Spermienkernen inkubiert.



Abbildung 12: Das Promotor Reportergen Konstrukt **pCShumHNF1 α GFP** linearisiert durch Restriktion mit *NotI*. Dieses Konstrukt wurde stabil in das Genom von *Xenopus laevis* integriert. Der orange Balken stellt den humanen HNF1 α Promotor dar. Blauer Kreis markiert die Bindestelle für HNF4. Der schwarze Pfeil markiert die Transkriptionsstartstelle 225bp vor dem Startcodon von HNF1 α .

Mit diesem Gemisch wurden anschließend *Xenopus laevis* Eier injiziert. Insgesamt wurden 83 Larven des Larvenstadiums 38 generiert (siehe Tabelle 5). Diese Larven wurden dann unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem GFP spezifischen Filterset auf GFP fluoreszierendes Gewebe untersucht. Es konnte jedoch bei keiner Larve eine Expression des Reporters GFP in endodermalen oder mesodermalen Geweben festgestellt werden. In zwei Larven konnte eine einzelne GFP positive Zelle detektiert werden. Eine artifizielle Promotoraktivität in anderen Körperregionen der Larve konnte ebenfalls in keinem Embryo beobachtet werden.

Tabelle 5: Expressionsprofil des Promotor Reportergen Konstrukts **pCShumHNF1 α GFP** nach stabiler Integration in das Genom von *Xenopus laevis*

Injizierte Eier	Befruchtete Eier	Larven im Stadium 38	GFP Fluoreszenz:	
			Mesoderm und/oder Endoderm	In einer einzelnen Zelle
5450	525	83	0	2

Abschließend kann man schlussfolgern, dass die mit dem Promotor Reportergen Konstrukt pCShumHNF1 α GFP erzielten Ergebnisse die Schlussfolgerung nahelegen, dass der humane HNF1 α Promotor nicht ausreicht, um die Expression des Reportergens GFP in transgenen *Xenopus laevis* Embryonen zu steuern.

3.2 Analyse des HNF1 α Promotors aus *Xenopus laevis*

Da der humane HNF1 α Promotor keine Aktivität in transgenen *Xenopus laevis* Embryonen vermittelt, wurde für die weiteren Experimente der HNF1 α Promotor aus *Xenopus laevis* eingesetzt, von dem eine Aktivität in transgenen Xenopoden bereits beschrieben wurde (Ryffel and Lingott, 2000c).

3.2.1 Lokalisierung eines regulatorischen Elements im proximalen HNF1 α Promotor

Um die Elemente, welche eine endodermale Expression vermitteln, in dem HNF1 α Promotor zu identifizieren, können verschiedene Strategien angewendet werden. Ein möglicher Ansatz ist, Bereiche des Promotors zu entfernen und die so konstruierten Deletionmutanten auf ihre endodermale Aktivität zu überprüfen. Durch Vergleiche des Expressionsprofils der einzelnen Deletionsmutanten könnten die für die endodermale Aktivität verantwortlichen Elemente im Promotor von HNF1 α lokalisiert werden.

Mit dieser Strategie konnte durch transgene Promotor Reportergen Assays in *Xenopus laevis* gezeigt werden, dass durch eine Deletion des 3' Bereiches von -58 bis -207 im Promotor von HNF1 α die Aktivität des Promotors in endodermalen Geweben ausgelöscht wird (Ryffel and Lingott, 2000b). Eine genauere Lokalisierung des für die endodermale Expression verantwortlichen Elements wurde bislang jedoch nicht durchgeführt.

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass ein -4kb/-58HNF1 α Promotorfragment ein, dem -6kb/-58HNF1 α Promotor, identisches Expressionsprofil von GFP in transgenen Xenopoden vermittelt (Ryffel unveröffentlicht). Somit wurde der

-4kb/-58HNF1 α Promotor als Ausgangskonstrukt für die verschiedenen Deletionsmutanten verwendet. In Abbildung 13 sind die einzelnen Deletionskonstrukte des HNF1 α Promotors dargestellt. Die einzelnen HNF1 α Promotor Reportergen Konstrukte wurden mit *NotI* linearisiert und anschließend als transgen in *Xenopus laevis* eingeführt. Die so gewonnenen Embryonen wurden aufgezogen und ab dem Stadium 35-38 unter dem Fluoreszenzmikroskop auf GFP Fluoreszenz analysiert. Durch diese Versuche sollte geklärt werden, ob durch die verschiedenen Deletionen im 3`Bereich des *Xenopus* HNF1 α Promotors eine Veränderung im Expressionsprofil des Reporters GFP ausgelöst wird. Verglichen wurden diese Daten mit dem Expressionsprofil des -4kb/-58HNF1 α Promotor.

Wie in Abbildung 13 zu sehen, zeichnet sich das Promotor Konstrukt -4kb/-173HNF1 α dadurch aus, dass hier ein großer Teil des 3`Bereiches des HNF1 α Promotors deletiert ist. Um dieses Promotor Konstrukt auf seine endodermale Aktivität zu überprüfen, wurden Eier von *Xenopus laevis* Weibchen mit pCS-4kb/-173HNF1 α GFP inkubierten Spermienkernen injiziert. Wie in Tabelle 6 aufgeführt, konnten mit dieser Technik 26 GFP positive Larven produziert werden. Alle Larven zeigten eine GFP Fluoreszenz im mesodermalen Pronephros. Eine endodermale Expression von GFP konnte jedoch nur in einem einzigen Tier nachgewiesen werden. Es zeigte somit nur 1 Tier von 26 Tieren eine GFP Expression im Mesoderm und Endoderm.

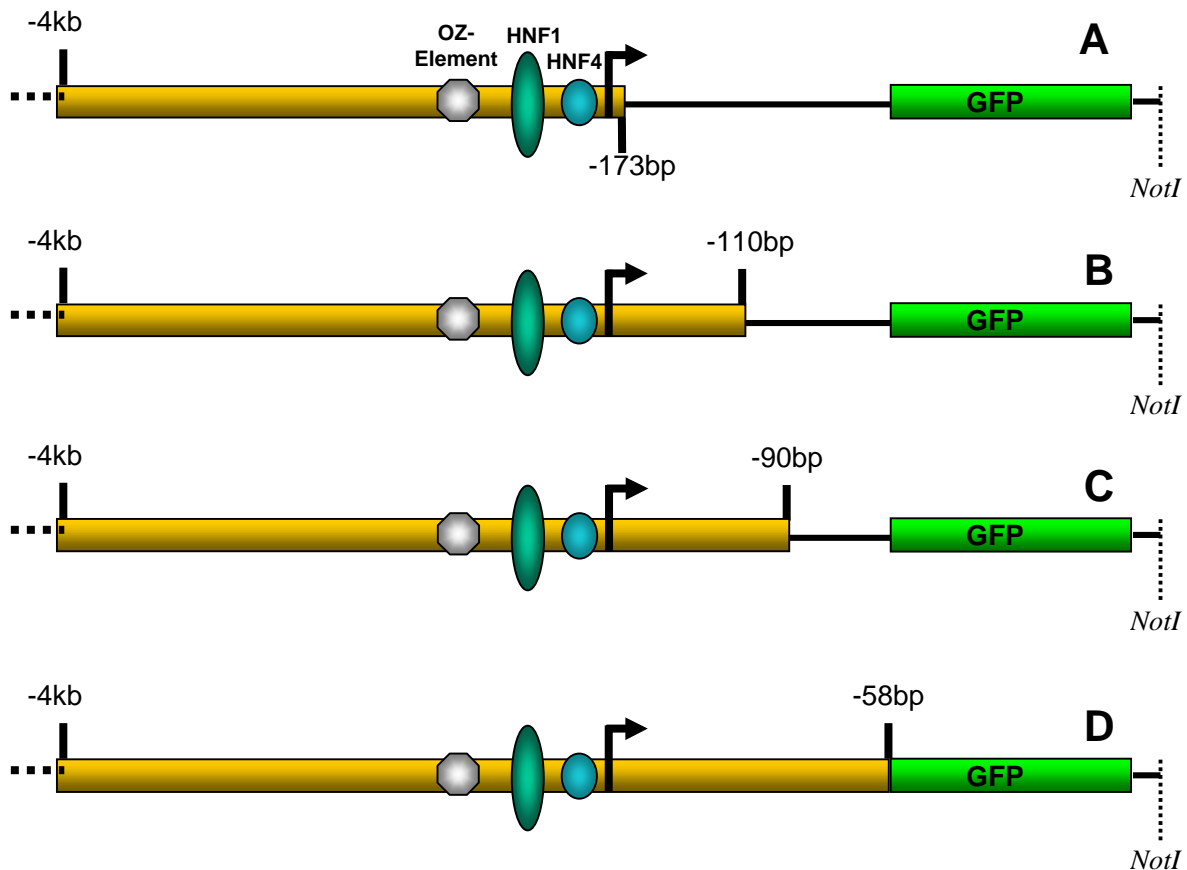


Abbildung 13: Die Promotor Reporter Gen Konstrukte **pCS-4kb/-173HNF1 α GFP(A)**, **pCS-4kb/-110HNF1 α GFP(B)**, **pCS-4kb/-90HNF1 α GFP(C)** und **pCS-4kb/-58HNF1 α GFP(D)** linearisiert durch Restriktion mit *NotI*. Diese Konstrukte wurden stabil in das Genom von *Xenopus laevis* integriert. Der gelbe Balken stellt den HNF1 α Promotor aus *Xenopus* dar. Rot markiert ist das TG-Motiv. Die eingeführte Deletion ist als schwarzer Strich dargestellt. Der schwarze Pfeil markiert die Transkriptionsstartstelle bei -216.

Tabelle 6: Mesodermale und Endodermale Expression von GFP vermittelt durch stabile Integration des Promotor Reporter Gen Konstrukts **pCS-4kb/-173HNF1 α GFP** in das Genom von *Xenopus laevis*

Injizierte Eier	Befruchtete Eier	Larven im Stadium 38	GFP Fluoreszenz:	
			Mesoderm und Endoderm	Mesoderm
6350	404	115	1	25

In Abbildung 14 sind zwei transgene Larven des Stadiums 38 gezeigt. In Bild A ist eine transgene Linie abgebildet, die sich durch eine mesodermale Promotoraktivität auszeichnet. Bei dieser Larve lässt sich eine GFP Fluoreszenz ausschließlich im Pronephros beobachten, wohingegen das gesamte Endoderm GFP negativ ist. In Bild B ist die transgene Larve gezeigt, welche sich durch eine GFP Fluoreszenz im Pronephros und im Endoderm

auszeichnet. Dies ist die einzige Linie, bei der neben der mesodermalen auch eine endodermale Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Festzustellen bleibt, dass transgene Linien, die mit dem -4kb/-173HNF1 α Promotor Fragment generiert worden sind, sich dadurch auszeichnen, dass das Potential des Promotors, eine Expression im endodermalen Gewebe zu vermitteln, drastisch reduziert ist. Die Aktivität des Promotors im mesodermalen Gewebe scheint hingegen nicht betroffen zu sein.

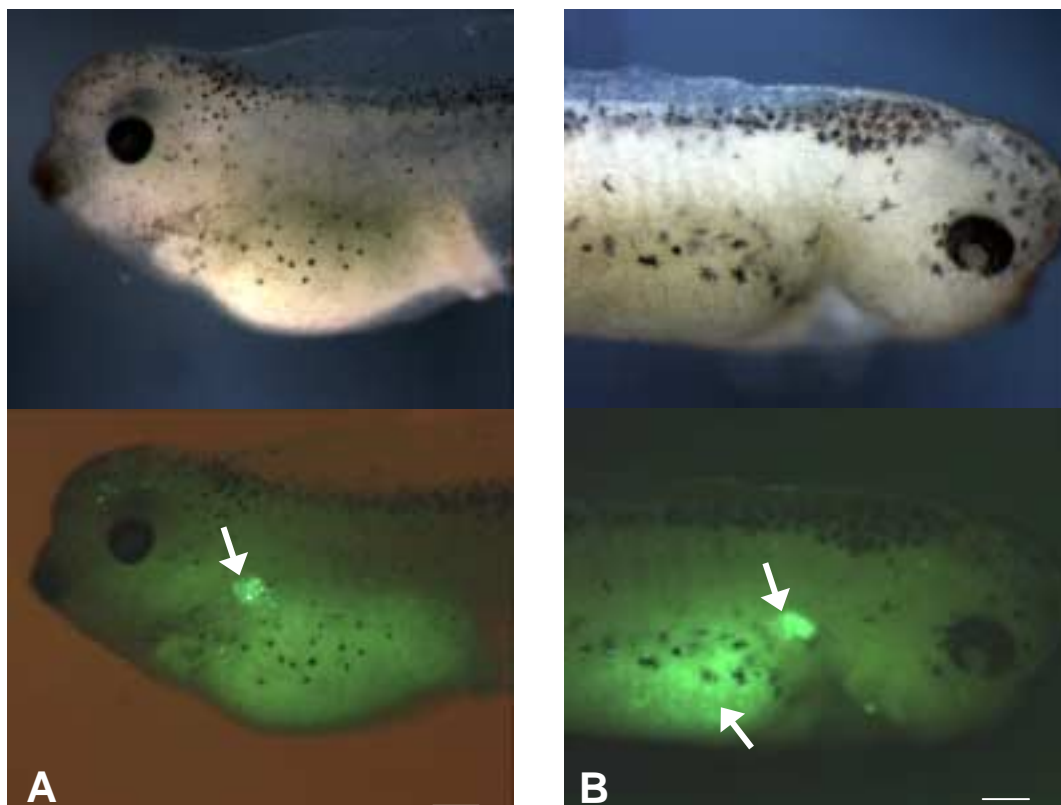


Abbildung 14: Expressionsprofil des Promotor Reportergen Konstrukts **pCS-4kb/-173HNF1 α GFP** in transgenen Larven. Gezeigt sind zwei Larven, in die das Konstrukt-4kb/-173HNF1 α GFP als Transgen stabil integriert worden ist. Die Larven wurden im Stadium 38 photographiert. Die oberen Photos zeigen die Larven jeweils unter Normallicht. Die unteren Abbildungen wurden unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP spezifischen Filterset aufgenommen. Abbildung A zeigt eine transgene Larve mit ausschließlich mesodermaler Expression. In Abbildung B wurde eine transgene Larve photographiert, die eine Expression von GFP sowohl im Mesoderm als auch im Endoderm aufweist. Die weißen Pfeile markieren die GFP positiven Gewebe.

Im Gegensatz zu -4kb/-173HNF1 α ist bei dem Promotor Fragment -4kb/-110HNF1 α ein größerer Teil des 3`Bereiches vorhanden. Es sollte überprüft werden, ob dieses Fragment ausreicht um die Aktivität des HNF1 α Promotors in endodermalen Geweben zu vermitteln. Hierzu wurde pCS-4kb/-110HNF1 α GFP mit *NotI* linearisiert und als Transgen in *Xenopus* eingeführt. Wie in Tabelle 7 aufgeführt, konnten insgesamt 4 transgene Larven generiert werden. Alle Larven zeigten eine GFP Fluoreszenz im mesodermalen Pronephros. Eine endodermale Expression von GFP konnte in keiner der transgenen Linien nachgewiesen werden. Es konnte bei den mit pCS-4kb/-110HNF1 α GFP hergestellten transgenen Linien ausschließlich eine Expression von GFP in dem aus dem Mesoderm entstehenden Pronephros beobachtet werden.

Tabelle 7: Mesodermale und endodermale Expression von GFP vermittelt durch stabile Integration des Promotor Reportergen Konstrukts **pCS-4kb/-110HNF1 α GFP** in das Genom von *Xenopus laevis*

Injizierte Eier	Befruchtete Eier	Larven im Stadium 38	GFP Fluoreszenz:	
			Mesoderm und Endoderm	Mesoderm
5000	331	89	0	4

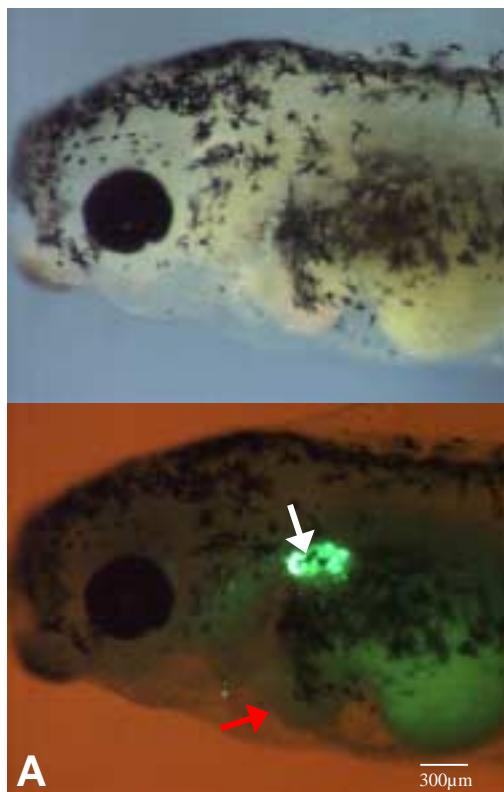


Abbildung 15: Expressionsprofil des Promotor Reportergen Konstrukts pCS-4kb/-110HNF1 α GFP in transgenen Larven. Gezeigt ist eine Larve, in die das Konstrukt -4kb/-110HNF1 α GFP als Transgen stabil integriert worden ist. Die Larve wurde im Stadium 40 photographiert. Das obere Photo zeigt die Larve unter Normallicht. Die untere Abbildung wurde unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP spezifischen Filterset aufgenommen. Bild A zeigt eine transgene Linie die eine mesodermale Expression von GFP zeigt. Der GFP positive Pronephros ist mit einem weißen Pfeil markiert. Der rote Pfeil markiert die GFP negative Leber.

In Abbildung 15 ist eine transgene Larve des Stadiums 40 gezeigt. Bei dieser Larve lässt sich eine GFP Fluoreszenz ausschließlich im Pronephros beobachten, wohingegen das gesamte Endoderm GFP negativ ist. Diese transgene Linie zeichnet sich somit durch eine mesodermale Promotoraktivität aus.

Zusammenfassend kann man sagen, dass transgene Linien die mit dem -4kb/-110HNF1 α Promotorfragment hergestellt worden sind, keinerlei Aktivität in endodermalen Geweben zeigen. Die Aktivität des Promotors im Mesoderm war nicht reduziert.

Das Promotor Konstrukt -4kb/-90HNF1 α beinhaltet 20 Nukleotide mehr als -4kb/-110HNF1 α . Das pCS-4kb/-90HNF1 α GFP Promotor Reporter Gen Konstrukt wurde als Transgen in *Xenopus* integriert und hinsichtlich seiner endodermalen Aktivität analysiert. Tabelle 8 zeigt, dass insgesamt 14 Tiere hergestellt werden konnten, bei denen GFP fluoreszierendes Gewebe beobachtet wurde. Alle 14 Tiere zeigten einen GFP positiven Pronephros. Bei 4 der 14 Tiere konnte zusätzlich eine GFP Fluoreszenz im Endoderm beobachtet werden. Somit konnte bei einem Teil der transgenen *Xenopoden* eine Expression von GFP sowohl in mesodermalem als auch in endodermalem Gewebe nachgewiesen werden.

Tabelle 8: Mesodermale und endodermale Expression von GFP vermittelt durch stabile Integration des Promotor Reporter Gen Konstrukts **pCS-4kb/-90HNF1 α GFP** in das Genom von *Xenopus laevis*

Injizierte Eier	Befruchtete Eier	Larven im Stadium 38	GFP Fluoreszenz:	
			Mesoderm und Endoderm	Mesoderm
4200	283	54	4	10

In Abbildung 16 sind 2 transgene Linien mit den unterschiedlichen GFP Expressionsprofilen dargestellt. In Bild A ist ein Tier im Stadium 38 gezeigt, bei dem die durch einen weißen Pfeil markierte GFP Fluoreszenz im Pronephros des Embryos zu sehen ist. Im gesamten Endoderm ist hingegen keine Expression von GFP zu erkennen. Bei der transgenen Linie in Bild B ist eine GFP Fluoreszenz sowohl im Pronephros als auch im Endoderm zu detektieren.

Bei dieser Larve ist auch eine Ausstülpung im unteren Kopfbereich zu erkennen. Dies lässt sich auf die Injektion der Spermienkerne mit einer Glaskapillare zurückführen. Hierbei wird das Ei beschädigt, was in der weiteren Entwicklung zu solchen Ausstülpungen führen kann.

Durch das Konstrukt pCS-4kb/-90HNF1 α GFP wurde bei ungefähr einem Drittel der transgenen Linien eine mesodermale und endodermale Reportergen Expression ausgelöst. Dies zeigt, dass das endodermale Aktivierungspotential des ursprünglichen HNF1 α Promotors in diesem Konstrukt größtenteils vorhanden ist.

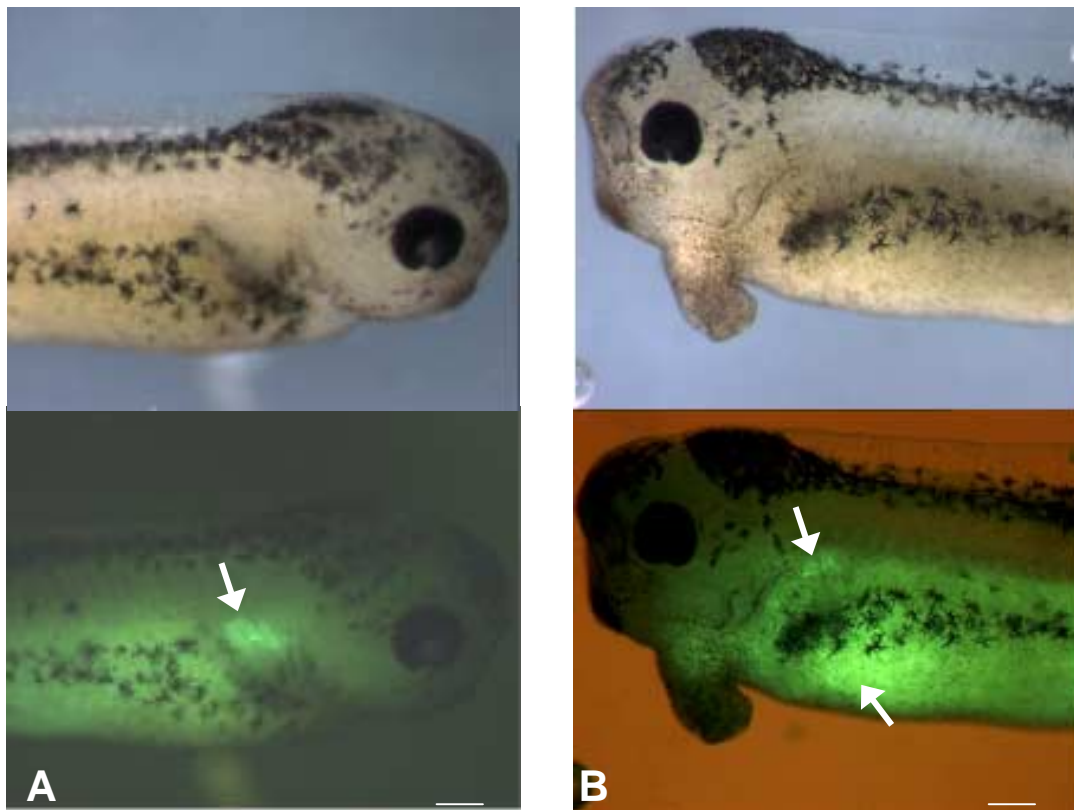


Abbildung 16: Expressionsprofil des Promotor Reportergen Konstruktes pCS-4kb/-90HNF1 α GFP in transgenen Larven. Gezeigt sind zwei Larven, in die das Konstrukt pCS-4kb/-90HNF1 α GFP als transgen stabil integriert worden ist. Die Larven wurden im Stadium 38 photographiert. Die oberen Photos zeigen die Larven jeweils unter Normallicht. Die unteren Abbildungen wurden unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP spezifischen Filterset aufgenommen. Abbildung A zeigt eine transgene Larve mit einem GFP positiven Pronephros. In Abbildung B wurde eine transgene Larve photographiert, die GFP positiv im Mesoderm und Endoderm ist. Die weißen Pfeile markieren jeweils GFP positives Gewebe.

Die mit den einzelnen Konstrukten erzeugten transgenen Linien sind in Abbildung 17 hinsichtlich ihrer endodermalen Aktivität prozentual aufgeschlüsselt. Anhand dieser Graphik erkennt man, dass der -4kb/-173HNF1 α Promotor lediglich in 4% der transgenen Linien eine Aktivität im Endoderm aufweist. Im Falle des -4kb/-110HNF1 α Promotorfragments liegt die

endodermale Aktivität in transgenen Linien sogar bei 0%. Man kann hieraus deutlich erkennen, dass sowohl das -4kb/-173HNF1 α als auch das -4kb/-110HNF1 α Promotorfragment ihr endodermale Aktivierungspotential verloren haben. Der -4kb/-90HNF1 α Promotor hingegen vermittelt in 29% der transgenen Linien eine endodermale Reporter-gen Expression. Durch einen Vergleich mit dem -4kb/-58HNF1 α Promotor, welcher bei 50% der transgenen Linien im Endoderm aktiv ist, wird deutlich, dass das -4kb/-90HNF1 α Promotorfragment ausreicht, um in einem großen Teil der transgenen Linien endodermale Aktivität zu vermitteln. Bei der Analyse dieser Daten ist insbesondere die Beobachtung interessant, dass die Promotoren -4kb/-110HNF1 α und -4kb/-90HNF1 α sich hinsichtlich ihrer endodermalen Aktivität sehr stark unterscheiden. Der Unterschied zwischen diesen beiden Promotorkonstrukten beschränkt sich auf nur 20 Nukleotide. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese 20 Nukleotide wichtig für die Aktivität des HNF1 α Promotors in Geweben endodermalen Ursprungs sind.

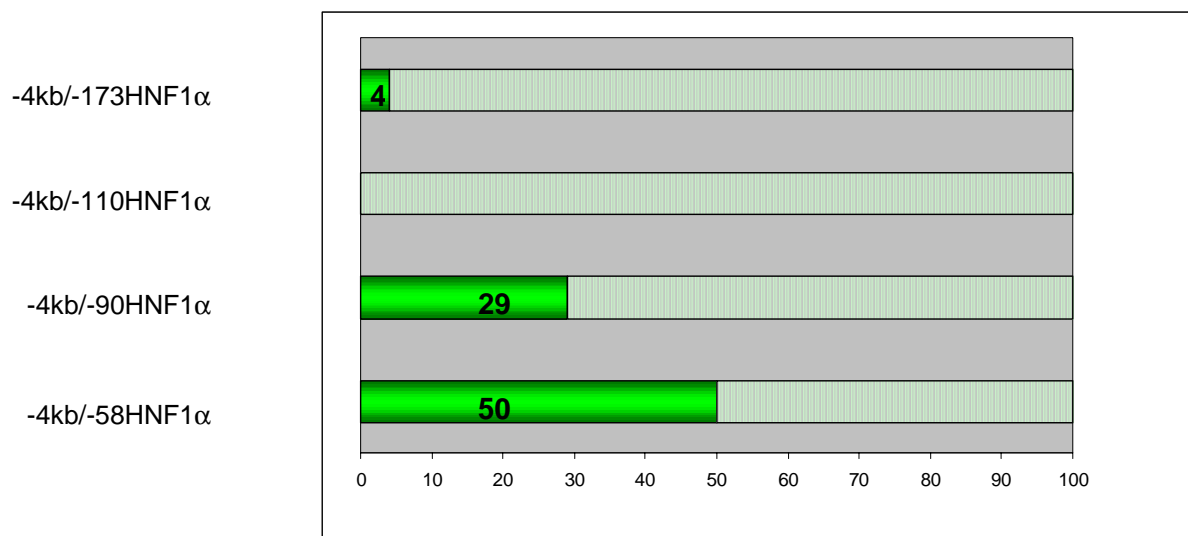


Abbildung 17: Endodermale GFP Expression im prozentualen Verhältnis zur mesodermalen GFP Expression. Grüner Balken entspricht den transgenen Linien mit mesodermaler und endodermaler GFP Fluoreszenz. Die gesamte Skala (100%) entspricht den transgenen Linien mit positivem Mesoderm.

3.2.2 Eine mit MODY assoziierte Punktmutation im HNF1 α Promotor hat keinen Einfluß auf die Promotoraktivität in transgenen Xenopoden

Ein zweiter Ansatz, um die Elemente, welche eine endodermale Expression vermitteln, in dem HNF1 α Promotor zu identifizieren, besteht darin, durch die Einführung von Mutationen in auffällige Sequenzmotive zu überprüfen, ob durch diese gezielte Mutation des Promotors das Expressionsprofil des Reportergens verändert wird.

In Abbildung 18 ist die proximale Promotorsequenz des humanen HNF1 α Promotors im Vergleich zum HNF1 α Promotor aus *Xenopus* gezeigt. Die roten Pfeile markieren die Stellen an denen in MODY3 Patienten Sequenzveränderungen im humanen HNF1 α Promotor gefunden worden waren. Weiterhin erkennt man an dem Sequenzvergleich zwischen humanem und *Xenopus* HNF1 α Promotor, dass der regulatorische Bereich des *Xenopus* HNF1 α Gens eine hohe Homologie zu dem humanen Promotor aufweist. Beispielsweise ist die Bindestelle für HNF4 in beiden Promotoren stark konserviert. In diesem Bereich weisen beide Promotorsequenzen eine Homologie von 100% auf.

Betrachtet man nun die HNF1 α Promotorsequenz aus *Xenopus*, findet man ein Sequenzmotiv von 4 Thyminen und 7 Guaninen. Dieses TG Motiv liegt außerdem innerhalb des, für die endodermale Aktivität wichtigen, 20bp Bereiches. Im humanen HNF1 α Promotor ist ebenfalls ein Motiv aus 4 Thyminen gefolgt von 7 Guaninen markiert durch einen grünen Balken zu erkennen. Von den eingangs erwähnten MODY3 assoziierten Sequenzveränderungen im HNF1 α Promotor sind 3 in diesem Sequenzmotiv identifiziert worden, wobei -119Gdel am besten dokumentiert wurde. Die Häufung der MODY3 assoziierten Sequenzveränderungen in diesem Sequenzmotiv könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei diesem Sequenzmotiv um ein wichtiges regulatorisches Promotorelement handelt. Um dies zu überprüfen, bietet es sich an, eine der MODY3 assoziierten Sequenzveränderung -119del im TG Sequenzmotiv des humanen HNF1 α Promotors entsprechende Mutation im TG Sequenzmotiv des HNF1 α Promotor aus *Xenopus* einzuführen.

Es wurde somit das Guanin, welches in Abbildung 18 durch einen roten Punkt markiert ist, im *Xenopus* HNF1 α Promotor deletiert. Der so veränderte HNF1 α Promotor erstreckt sich von -6kb bis -58bp, wobei das Guanin an Position -95 deletiert ist. In Abbildung 19 ist diese Mutation anhand der schematischen Darstellung des Promotor Reportergen Konstrukts pCSHNF1 α TGGFP gezeigt.

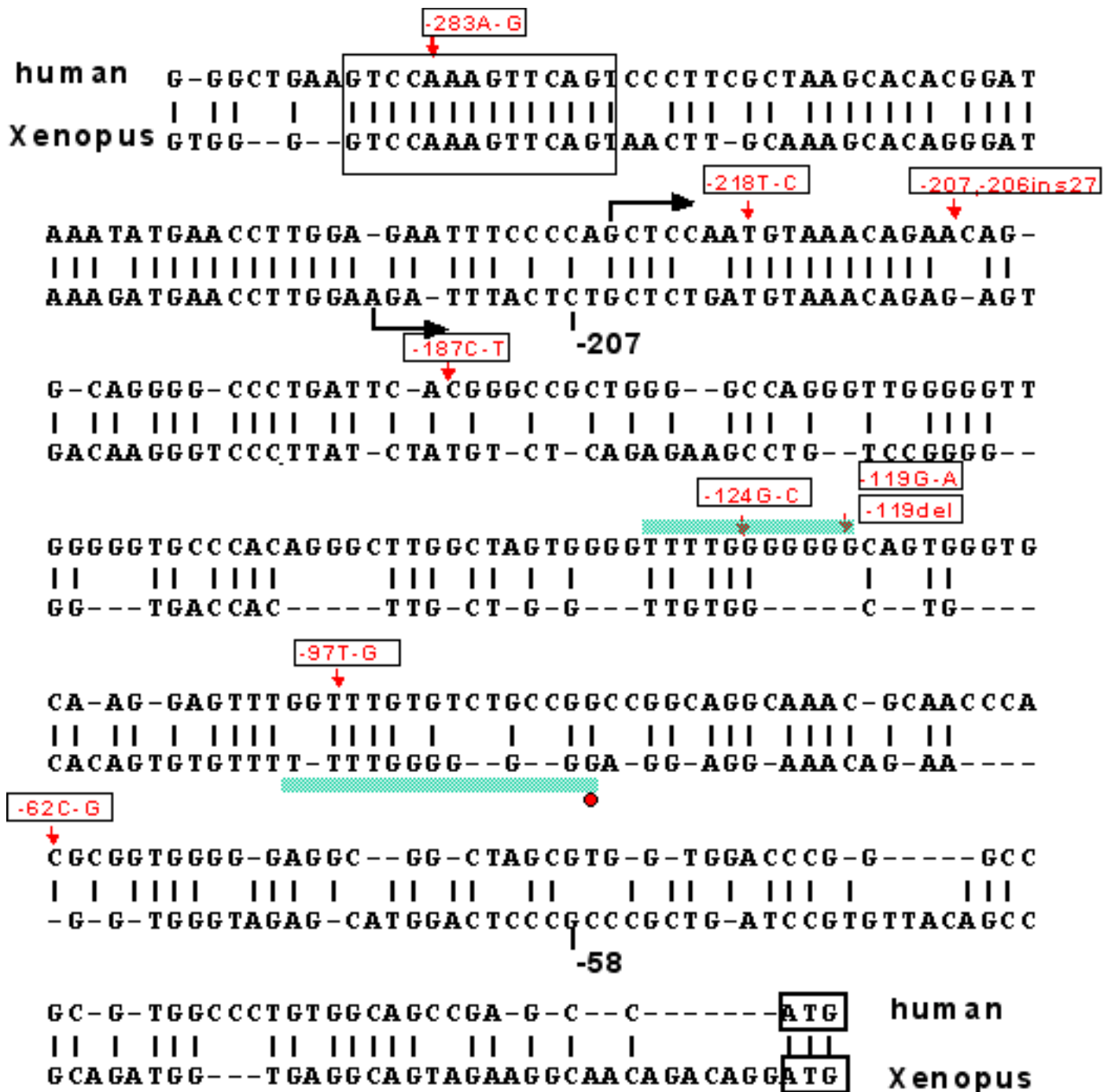


Abbildung 18: Sequenzvergleich des humanen HNF1 α Promotor mit dem HNF1 α Promotor aus Xenopus. Die schwarzen Pfeile markieren jeweils die Transkriptionsstartstelle. In roter Schrift sind die bekannten MODY3 assoziierten Sequenzveränderungen im humanen HNF1 α Promotor aufgeführt (Gragnoli et al., 1997; Godart et al., 2000; Yoshiuchi et al., 1999). Die hellblauen Balken markieren jeweils das TG Sequenzmotiv. Der rote Punkt markiert die eingeführte Deletion im TG Motiv des Xenopus Promotors.

Dieses Konstrukt wurde als Transgen stabil in *Xenopus* integriert. Die so produzierten transgenen Linien wurden hinsichtlich ihrer endodermalen GFP Expression analysiert. Anschließend wurde das ermittelte Expressionsprofil mit dem Expressionsprofil des -6kb/-58HNF1 α Promotors (Ryffel and Lingott, 2000a), verglichen.

Hierdurch sollte festgestellt werden, ob durch die Mutation des TG Sequenzmotivs im *Xenopus* HNF1 α Promotor eine Veränderung im Expressionsprofil des Reporters GFP ausgelöst wird.

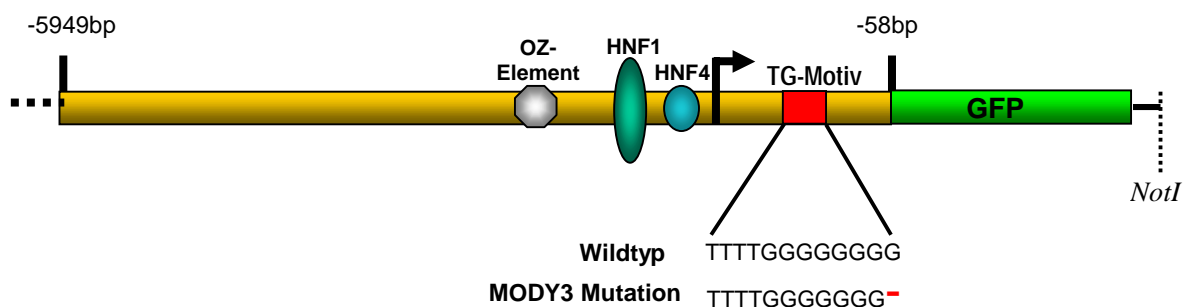


Abbildung 19: Das Promotor Reportergen Konstrukt **pCSHNF1 α TGGFP** linearisiert durch Restriktion mit *NotI*. Dieses Konstrukt wurde stabil in das Genom von *Xenopus laevis* integriert. Der gelbe Balken stellt den HNF1 α Promotor aus *Xenopus* dar. Rot markiert ist das TG-Motiv. Die eingeführte Deletion ist als roter Strich in dem Sequenzausschnitt dargestellt. Der schwarze Pfeil markiert die Transkriptionsstartstelle bei -216.

Aus 12860 Eiern die mit dem pCSHNF1 α TGGFP/Spermienkern Gemisch injiziert wurden, teilten sich 1279. Das Stadium 38 erreichten 290 Larven. 21 dieser Larven expremierten GFP. Mit dem Fluoreszenzmikroskop konnten hierbei zwei in ihrer GFP Fluoreszenz unterschiedliche Phänotypen identifiziert werden, die in Abbildung 20 gezeigt sind.

Das Tier in Bild A zeichnet sich durch einen grün fluoreszierenden Pronephros aus. Das Endoderm hingegen ist GFP negativ. Bei diesem Expressionsmuster ist die Aktivierung des Reportergens GFP auf die Organe mesodermalen Ursprungs beschränkt. In Bild B ist ein Embryo des Stadiums 38 einer weiteren transgenen Linie abgebildet. Hier ist neben dem GFP positiven Pronephros auch eine Fluoreszenz von GFP im Endoderm zu erkennen. In diesem Fall wird durch den Promotor HNF1 α TG eine Aktivierung des Reportergens GFP sowohl im Mesoderm als auch in endodermalen Geweben vermittelt.

Die Analyse aller 21 transgener Embryonen ergab, dass alle Linien eine GFP Expression im Pronephros zeigten. Bei 12 von 21 Tieren konnte neben der mesodermalen GFP Expression zusätzlich eine GFP Fluoreszenz im Endoderm nachgewiesen werden. Folglich aktivierte in

diesen transgenen Linien der HNF1 α TG Promotor das Reportergen GFP sowohl im Mesoderm als auch im Endoderm.

Es bleibt festzuhalten, dass das Promotor Reportergen Konstrukt pCSHNF1 α TGGFP in transgenen Xenopoden neben der immer gezeigten mesodermalen Aktivität eine Aktivität im Endoderm in einem gewissen Prozentsatz der transgenen Linien zeigt. Da diese beiden verschiedenen Phänotypen auch in unterschiedlichen transgenen Linien des Wildtyp HNF1 α Promotors zu beobachten sind, stellt sich die Frage, ob sich das Verhältnis zwischen den beiden Phänotypen durch die Mutation im TG Element ändert.

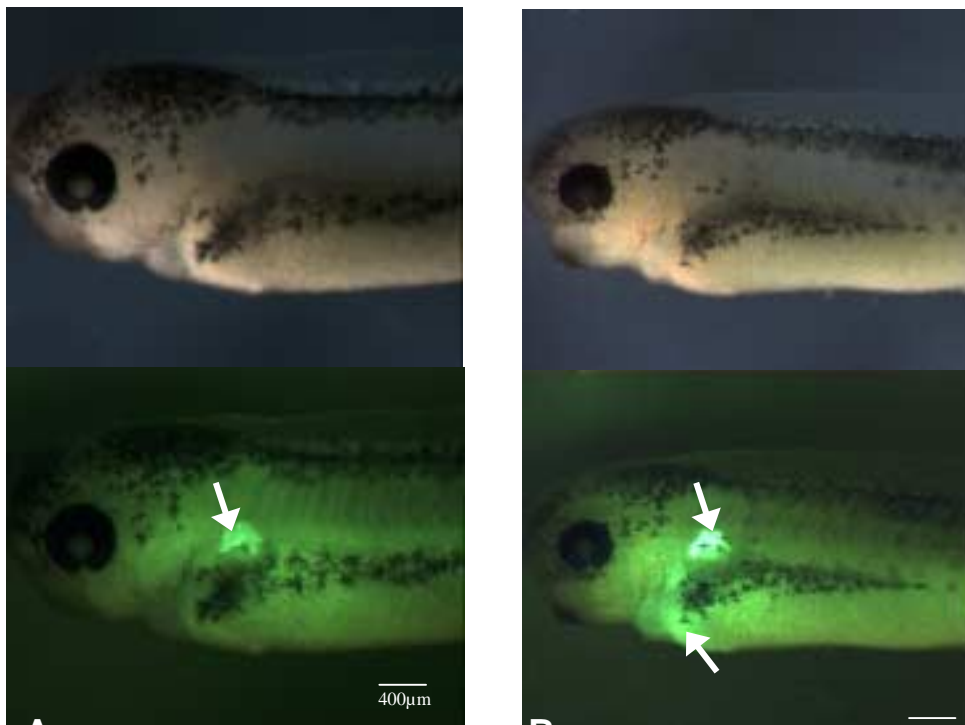


Abbildung 20: Expressionsprofil des Promotor Reportergen Konstruktes **pCSHNF1 α TGGFP** in transgenen Larven. Gezeigt sind zwei Larven, in die das Konstrukt pCSHNF1 α TGGFP als transgen stabil integriert worden ist. Die Larven wurden im Stadium 38 photographiert. Die oberen Photos zeigen die Larven jeweils unter Normallicht. Die unteren Abbildungen wurden unter Fluoreszenzlicht mit einem GFP spezifischen Filterset aufgenommen. Bild A zeigt eine transgene Larve mit einem GFP positiven Pronephros. In Bild B wurde eine transgene Larve mit GFP positivem Mesoderm und Endoderm photographiert. Die weißen Pfeile markieren die GFP positiven Gewebe.

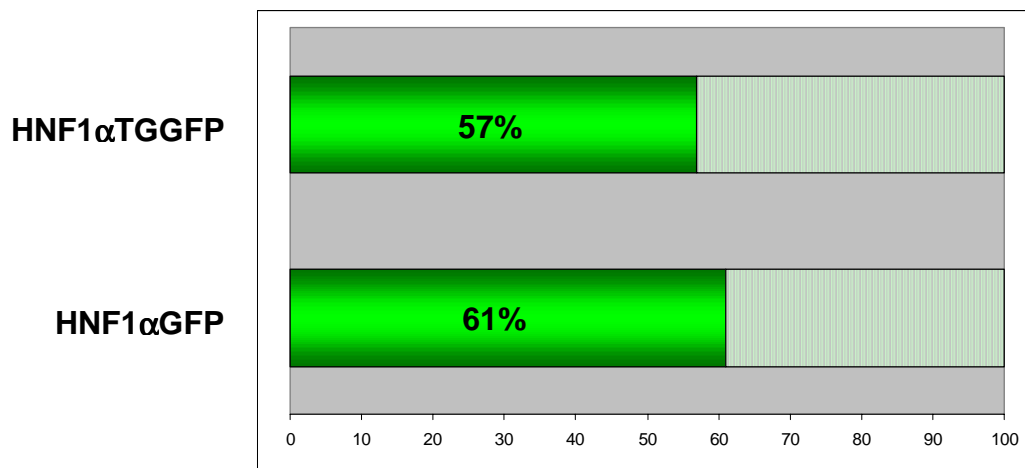


Abbildung 21: Endodermale GFP Expression im prozentualen Verhältnis zur mesodermalen GFP Expression. Grüner Balken entspricht den transgenen Linien mit mesodermaler und endodermaler GFP Fluoreszenz. Gesamter Balken (Grün + Grün/weiß) entspricht allen Linien mit positivem Mesoderm.

In Abbildung 21 ist das Verhältnis der beiden Phänotypen graphisch dargestellt. Man erkennt, dass der mutierte Promotor HNF1αTG in 57% der transgenen Linien eine mesodermale und endodermale Promotoraktivität aufweist. Im Vergleich dazu zeigt der Wildtyp HNF1α Promotor in 61% der transgenen Linien eine mesodermale und endodermale Aktivität. Hieraus kann man schließen, dass das Aktivierungspotential des mutierten HNF1α Promotors (HNF1αTG) mit dem Wildtyp HNF1α Promotor identisch ist.

Es konnte somit gezeigt werden, dass durch die Einführung einer mit MODY3 assoziierten Deletion im TG Sequenzmotiv keine Veränderung im gewebespezifischen Aktivierungspotential des HNF1α Promotors einhergeht.

3.2.3 Promotor Reportergen Analyse des *Xenopus* HNF1α Promotors in Säugerzelllinien

Der Einfluss des 20bp Bereiches auf die endodermale Aktivität des HNF1α Promotors sollte in Zellkultur Experimenten näher verifiziert werden. Anhand der im transgenen Tier gewonnenen Erkenntnisse war zu erwarten, dass eine Verkürzung des 3`Endes des HNF1α Promotors mit einer Reduktion der Promotoraktivität in endodermalen Geweben einhergeht.

Die Frage wäre hier, ob in Zelllinien endodermalen Ursprungs ebenfalls durch die Deletion des 20bp das Aktivierungspotential des HNF1 α Promotors nahezu ausgelöscht wird.

Da durch diese Experimente Rückschlüsse auf die Aktivität des HNF1 α Promotors in endodermalen Geweben gezogen werden sollte, wurden die Promotor Reporter Assays in den Hepatomazelllinien FT02B und HepG2 durchgeführt. In diesen Versuchen sollte ausschließlich der 3' Bereich des HNF1 Promotors untersucht werden. Aus diesem Grund wurde ein verkürztes HNF1 α Promotorfragment von -594 bis -58 als Ausgangskonstrukt verwendet. Die hergestellten kurzen Promotor Fragmente erstreckten sich von -594 bis -173, -128, -110, und -90 im HNF1 α Promotor. Als Referenz wurde der HNF1 α Promotor (-594/-58) verwendet. Diese Promotoren wurden in pGL3Basic vor das Reporter Gen Luciferase kloniert. Anschließend wurden FT02B oder HEPG2 Zellen mit den so hergestellten Konstrukten transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität der einzelnen Zelllysate im Luminometer gemessen.

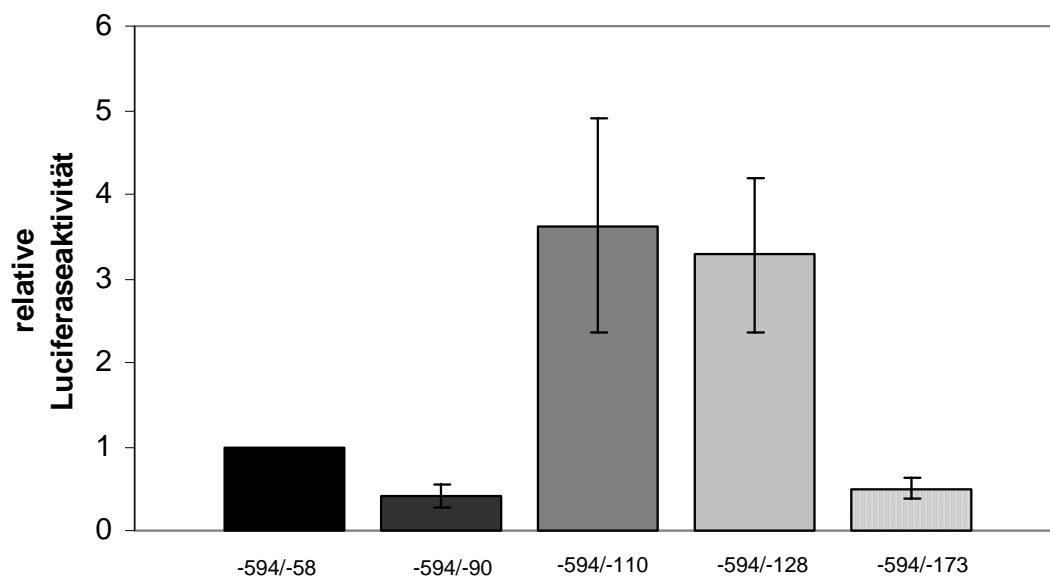


Abbildung 22: Aktivität der HNF1 α Promotor Reporter Gen Konstrukte in FT02B Zellen. 4 μ g der Promotor Reporter Gen Konstrukte **pGL3-594/-58HNF1 α** , **pGL3-594/-90HNF1 α** , **pGL3-594/-110HNF1 α** , **pGL3-594/-128HNF1 α** und **pGL3-594/-173HNF1 α** wurden in FT02B Zellen transfiziert. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität bei Transfektion mit pGL3-594/-58HNF1 α . Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von 6 unabhängigen Meßwerten an.

In Abbildung 22 sind die Potentiale der einzelnen HNF1 α Promotorkonstrukte, das Reporter Gen Luciferase in FT02B Zellen zu aktivieren, graphisch dargestellt. Angegeben ist die relative Luciferaseaktivität in Bezug zum HNF1 α Promotor Konstrukt pGL3-594/-

58HNF1 α . Man kann an dieser Graphik ablesen, dass das -594/-90HNF1 α Promotorfragment im Vergleich zu -594/-58HNF1 α eine stark reduzierte Aktivität in FT02B Zellen zeigt. Die Fragmente -594/-110HNF1 α sowie -594/-128HNF1 α zeigen hingegen eine deutlich höhere Aktivierung des Luciferasegens. Bei dem kürzesten Fragment -594/-173HNF1 α hingegen ist die Luciferaseaktivität jedoch wieder stark reduziert.

Abbildung 23 zeigt die relative Luciferaseaktivität der einzelnen HNF1 α Promotorkonstrukte in der Zelllinie HepG2. Die Aktivität des HNF1 α Promotor Konstrukts pGL3-594/-58HNF1 α ist hierbei gleich 1 gesetzt worden. Man kann an dieser Graphik ablesen, dass das -594/-90HNF1 α und das -594/-110HNF1 α Promotorfragment eine dem Wildtyp entsprechende Aktivität in HEPG2 Zellen zeigen. Ihr Aktivierungspotential entspricht dem des Wildtyps. Die Fragmente -594/-128HNF1 α und -594/-173HNF1 α zeigen ebenfalls keine signifikant höhere Aktivierung des Luciferasegens als -594/-58HNF1 α .

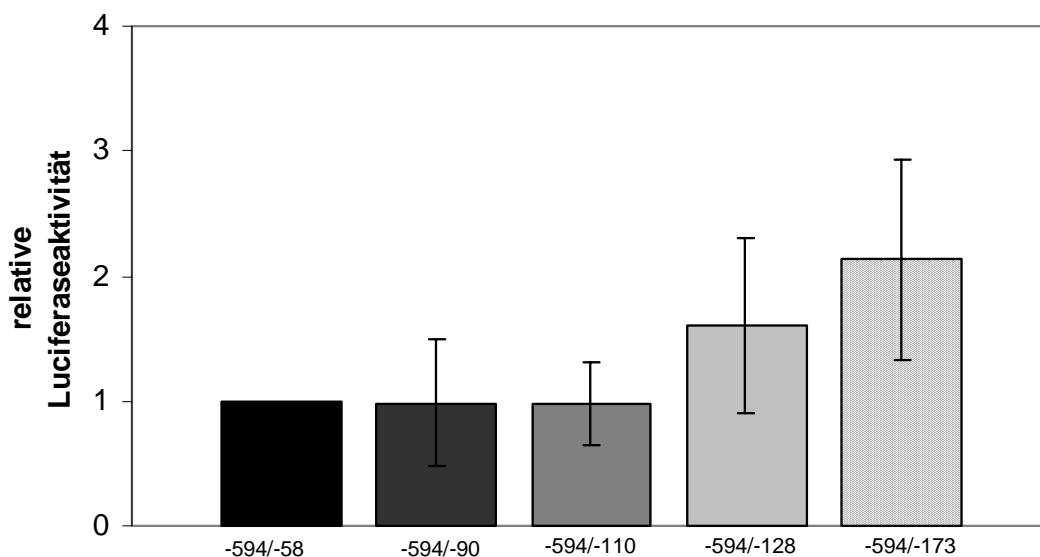


Abbildung 23: Aktivität der HNF1 α Promotor Reporter gen Konstrukte in FT02B Zellen. 4 μ g der Promotor Reporter gen Konstrukte pGL3-594/-58HNF1 α , pGL3-594/-90HNF1 α , pGL3-594/-110HNF1 α , pGL3-594/-128HNF1 α und pGL3-594/-173HNF1 α wurden in HEPG2 Zellen transfiziert. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität bei Transfektion mit pGL3-594/-58HNF1 α . Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von 6 unabhängigen Meßwerten an.

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass die, von den einzelnen HNF1 α Promotorkonstrukten vermittelte Aktivierung des Reportergens Luciferase, nicht übereinstimmend ist mit der Aktivität der entsprechenden HNF1 α Promotorkonstrukte im transgenen Organismus. Das Aktivierungspotential einzelner HNF1 α Promotorkonstrukte differiert ebenfalls in

Abhängigkeit von der gewählten Zelllinie. So zeigen die durch die HNF1 α Promotorkonstrukte vermittelten Luciferaseaktivitäten in den Hepatomazelllinien FT02B und HEPG2 keinerlei Übereinstimmung. Auch ist das Aktivierungspotential des pGL3-594/-58HNF1 α Ausgangskonstruktes im Vergleich zum Leervektor pGL3Basic um den Faktor 10 niedriger (Daten nicht gezeigt).

Diese Daten lassen vermuten, dass im Falle des HNF1 α Promotors sich Promotor Reporter Assays in Zelllinien nicht dafür eignen die regulatorischen Elemente zu identifizieren, welche für die spezifische Aktivität des HNF1 α Promotors in endodermalen Geweben verantwortlich sind.

IV. Diskussion

1 Expression transgener Reporter DNA unter Kontrolle des PDX-1 Promotors

In der vorliegenden Arbeit sollte der Maus PDX-1 Promotor hinsichtlich seiner Aktivität im sich entwickelnden Pankreas analysiert werden. PDX-1 wird zu Beginn der Pankreasentwicklung in allen Vorläuferzellen des endokrinen und exokrinen Pankreasgewebes exprimiert (Guz et al., 1995). Im ausdifferenzierten Pankreas ist PDX-1 in den β -Zellen, sowie in 15 % der δ -Zellen des endokrinen Pankreas aktiv (Peshavaria et al., 1994; Guz et al., 1995).

Ein 6,5kb großer Promotor des Ratten PDX-1 Gens konnte in transgenen Mäusen identifiziert werden (Sharma et al., 1996). Für das Maus PDX-1 Gen wurde zunächst gezeigt, dass ein Fragment von -4,5kb bis +8,5kb eine Expression im Pankreas transgener Mäuse vermittelt (Wu et al., 1997). Stoffers et al. zeigte 1999, dass 4,5kb der 5' flankierende Region des Maus PDX-1 Gens ausreichen, um eine Aktivität im Pankreas transgener Mäuse zu vermitteln (Stoffers et al., 1999).

Hinsichtlich seiner Aktivität in ausdifferenzierten β -Zellen wurde der PDX-1 Promotor ausgiebig analysiert. So vermittelte in Zellkultur Experimenten eine HSS1(-2560/-1880bp) Region eine β -zellspezifische Expression und ein *PstI/BstEII* (-2915/-1926bp) Fragment war in den β -Zellen transgener Mäuse aktiv (Wu et al., 1997). In dieser Promotorregion Es konnte in Promotor Reportergen Studien in β -Zelllinien gezeigt werden, dass eine in dieser Region lokalisierte HNF3 Bindestelle (-2006/-1996bp) essentiell für die Aktivität des PDX-1 Promotors in β -Zellen (Wu et al., 1997) ist.

Im Verlaufe der Dissertation konnte durch Sequenzvergleiche des Mensch, Maus und Huhn PDX-1 Promotors gezeigt werden, dass neben der proximalen E Box nur drei Regionen innerhalb des Promotors hochkonserviert sind. Diese Regionen sind im Bereich der HSS1 lokalisiert (Gerrish et al., 2000; Marshak et al., 2000). Von diesen drei Regionen vermittelten Region I und II, aber nicht Region III, eine Aktivität in β -Zellen, wobei in beiden Regionen eine Bindestelle für HNF3 β für die β -zellspezifische Aktivität essentiell war (Gerrish et al., 2000). Dies stimmt mit den Daten von Wu et al. 1997 überein, da dass von ihm verwendete *PstI/BstEII* PDX-1 Promotor Fragment die konservierten Regionen I und II ebenfalls enthält.

Samaras et al. zeigte 2002 in transgenen Mäusen, dass die Region II, nicht aber Region I ausreicht, um eine Reporter-gen Expression in den β -Zellen des Pankreas zu vermitteln, und dass die Aktivität des *PstI/BstEII* PDX-1 Promotor Fragments mit einer mutierten HNF3 Bindestelle in Region II in der β -Zellpopulation transgener Mäuse stark reduziert ist (Samaras et al., 2002). ChIP (Chromatin Immunopräzipitation) Assays zeigten, dass speziell HNF3 β an diese HNF3 Bindestelle bindet, was auf eine wichtige Rolle von HNF3 β bei der Regulation der PDX-1 Expression in β -Zellen schließen lässt (Samaras et al., 2002). Weitere ChIP (Chromatin Immunopräzipitation) Assays zeigten, dass Pax6, ein Faktor der z.B. für die Entwicklung der α -Zellen essentiell ist, an eine Subdomäne der Region II bindet (Samaras et al., 2002).

Ein weiterer wichtiger Faktor scheint der Transkriptionsfaktor RIPE3b1 zu sein. In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde gezeigt, dass RIPE3b1 ein Aktivator der Insulin Expression ebenfalls an eine Subdomäne der Region II bindet und so die, durch die Region II vermittelte, Aktivität in β -Zellen stimuliert (Samaras et al., 2003).

Ferner wurde in der Region I eine HNF1 Bindestelle identifiziert, an die HNF1 α *in vitro* bindet und die Aktivität von Region I Promotor Reporter-gen Konstrukten in β -Zelllinien stimuliert (Gerrish et al., 2001). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das PDX-1 Protein an die Region I binden kann, was auf eine Autoregulation der PDX-1 Expression durch PDX-1 schließen lässt (Gerrish et al., 2001; Marshak et al., 2000).

Die Elemente, die für die Aktivität des PDX-1 Gens in frühen Embryonalstadien, in denen PDX-1 im gesamten pankreatischen Epithelium exprimiert wird, verantwortlich sind, wurden bis heute jedoch nicht identifiziert.

Der 4,5kb große PDX-1 Promotor aus der Maus wurde in dieser Arbeit mittels Promotor Reporter-gen Assays in transgenen Xenopoden analysiert. Hierzu wurde der PDX-1 Promotor vor das GFP Gen kloniert, so dass GFP unter der Kontrolle des PDX-1 Promotors exprimiert wird. Die mit diesem Konstrukt hergestellten transgenen Xenopus Embryonen zeichneten sich durch einen grün fluoreszierenden Pankreas aus (Abbildung 2). Der Beginn der GFP Expression geht dabei einher mit dem Beginn der Pankreasentwicklung und wurde im Stadium 34/35 erstmals detektiert (Abbildung 2D). In das gleiche Zeitfenster fällt auch der Expressionsbeginn des Xenopus *Xlhb*8 Gens im Stadium 33 (Wright et al., 1989).

Die Expression von GFP ist in beiden Ausstülpungen des dorsalen und ventralen Endoderms zu detektieren (Abbildung 2B). Von diesem Zeitpunkt an lässt sich die grüne Fluoreszenz im Pankreas durchgehend bis zu den späteren Entwicklungsstadien beobachten (Abbildung 2C). Durch *in situ* Hybridisierungen von transgenen Xenopoden, in denen GFP unter der Kontrolle

des PDX-1 Promotors exprimiert wird, wurde gezeigt, dass die Menge der GFP mRNA in den Entwicklungsstadien 44 bis 46 stark abnimmt (Beck and Slack, 1999). Daher wird die GFP Fluoreszenz in den Entwicklungsstadien ab 46 vermutlich nicht durch einen aktiven PDX-1 Promotor vermittelt, sondern durch GFP, welches in früheren Stadien exprimiert und aufgrund seiner Stabilität immer noch im Pankreasgewebe vorhanden ist.

Der PDX-1 Promotor war ebenfalls im Auge der transgenen Larven aktiv (Abbildung 2). Diese Beobachtung wurde ebenfalls von Beck und Slack, 1999 gemacht. Die Aktivität des PDX-1 Promotor Reporter Gen Konstrukts im Auge der transgenen Larven entspricht jedoch weder dem Profil des PDX-1 Promotor in der Maus (Wu et al., 1997; Stoffers et al., 1999) noch dem Xenopus Homolog von PDX-1, XlhbBox8 (Wright et al., 1989) und scheint somit artifiziell zu sein.

Um herauszufinden welche Bereiche des PDX-1 Promotors essentiell für die Aktivität im Pankreas sind, bot es sich an, einen Teil des Promotors zu deletieren und in transgenen Xenopoden zu überprüfen, ob durch die Deletion auch die Aktivität des Promotors im Pankreas ausgelöscht wird. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass der deletierte Bereich des Promotors wichtig für die Aktivität im Pankreas ist.

Es konnte gezeigt werden, dass das -4,5kbPDX-1delGFP Konstrukt (Abbildung 3), bei dem 1kb (von -1926/-910) des PDX-1 Promotors deletiert ist, keine GFP Expression im Pankreas transgener Xenopoden vermittelt (Tabelle 2 und Abbildung 4). Die Aktivität im Auge scheint durch die Deletion nicht betroffen zu sein, da sich weiterhin eine grüne Fluoreszenz im Auge der transgenen Tiere feststellen lässt (Abbildung 4). Die Tatsache, dass in 2 Larven ein GFP positive Pronephros zu beobachten ist und weder das Maus PDX-1 noch XlhbBox8 in der Niere bzw. dem Pronephros exprimiert wird, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die ursprüngliche Gewebespezifität des PDX-1 Promotors ausgelöscht ist.

Das -4,5kbPDX-1del Fragment beinhaltet das komplette *PstI/BstEII* Fragment und folglich die konservierten Regionen I und II. Somit sind alle Elemente, welche die Aktivität des PDX-1 Promotors in den ausdifferenzierten β -Zellen regulieren, in dem -4,5kbPDX-1del Fragment vorhanden. Aus der Tatsache, dass der -4,5kbPDX-1del Promotor keine Reporter Gen Expression im pankreatischen Epithelium bzw. im gesamten sich entwickelnden Pankreas vermittelt, kann man zwei Schlüsse ziehen. Erstens scheinen in dem -4,5kbPDX-1del Promotor Fragment die Elemente zu fehlen, welche eine Aktivität im pankreatischen Epithelium bzw. im gesamten sich entwickelnden Pankreas vermitteln. Zweitens scheinen diese Elemente nicht identisch mit den Elementen zu sein, welche für die Aktivität in ausdifferenzierten β -Zellen verantwortlich sind. Diese Annahmen stimmen mit

denen von Gerrish et al. 2000 angestellten Vermutungen überein. Er vermutete, dass sich die Regulationselemente in der Region III der HSSI oder in der HSSII befindet (Gerrish et al., 2000). In -4,5kbPDX-1del sind sowohl die Region III als auch ein großer Teil der HSSII deletiert, was man als einen ersten Hinweis deuten kann, dass diese Regionen an der Regulation der Aktivität des PDX-1 Promotors im nicht ausdifferenzierten Pankreas beteiligt sind.

2 Ein Hybrid aus dem Maus Albumin Enhancer und 68 kDa Albumin Promotor ist in der Leber transgener Xenopoden aktiv.

Durch Transfektionen von Promotor Reporter Gen Konstrukten in Zelllinien konnte gezeigt werden, dass ein kurzes Fragment des 68 kDa Albumin Promotors ausreicht, um eine spezifische Expression in Leberzelllinien zu vermitteln (Schorpp et al., 1988b; Schorpp et al., 1988a). Fraglich war nun, ob ein kurzes 68 kDa Albumin Promotorfragment in transgenen Xenopoden eine leberspezifische Reporter Gen Expression vermittelt. Das Promotor Reporter Gen Konstrukt -700kbAlbGFP (Abbildung 5) zeigt keine Expression von GFP in der Leber von transgenen Xenopus Embryonen (Abbildung 6A). Es vermittelt jedoch eine GFP Expression in Zellen des Schwanzes (Abbildung 6B/C). Da dies nicht mit dem Expressionsprofil des endogenen 68 kDa Albumin Gens übereinstimmt, scheint die Aktivität des 68 kDa Albumin Promotorfragmentes in den Zellen des Schwanzes artifiziell zu sein.

Ein 4,2kb langes Fragment des 68kDa Albumin Promotors führt in transgenen Xenopoden ebenfalls nicht zu einer leberspezifischen Aktivierung des Reportergens (Abbildung 8B). Die mit diesem Konstrukt hergestellten transgenen Xenopus Embryonen zeichnen sich vielmehr durch eine artifizielle Expression von GFP in Zellen des Schwanzes (Abbildung 8C) sowie im Bereich des Larvenkopfes (Abbildung 8A/B) aus. Aus diesen Daten kann man schließen, dass im Falle des 68 kDa Albumin Gens, Elemente für eine leberspezifische Aktivität im transgenen Tier essentiell sind, die nicht in der unmittelbaren Promotor Region liegen.

In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde die Entwicklung des vaskulären Systems in Xenopus charakterisiert. Es wurden die Endothelzellen mit dem Marker Dil-Ac-LDL (DIL-labeled acetylated low-density lipoprotein) versehen, um einen dreidimensionalen Atlas des vaskulären Systems zu erstellen (Levine et al., 2003). Auffällig ist hierbei, dass das Profil der

markierten Endothelzellen eine große Ähnlichkeit mit dem GFP Expressionsprofil der 68 kDa Albumin Promotor Fragmente hat. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Fragmente des 68 kDa Albumin Promotors in ihrer Gewebespezifität derart verändert sind, dass sie eine Reportergen Expression in den Endothelzellen von *Xenopus* vermitteln. Dass Promotor Fragmente oder mutierte Promotoren ein unerwartetes Aktivitätsprofil zeigen, konnte auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden. So zeigte ein Fragment des IRBP Promotors neben der erwarteten Aktivität in der Retina auch eine Aktivität in Teilbereichen des Gehirns (Boatright et al., 2001) und ein mutierter ANF Promotor war nicht nur im Herz sondern auch im Pronephros aktiv (Small and Krieg, 2003).

Interessanterweise konnte bei Untersuchungen des Albumin Promotors aus der Maus festgestellt werden, dass durch kurze Promotorfragmente zwar eine Reportergen Expression in Leberzelllinien vermittelt wird (Heard et al., 1987), diese Fragmente jedoch nicht in der Lage sind eine leberspezifische Expression von Reportergen in transgenen Mäusen auszulösen. Insofern scheint es bei der Regulation der Aktivität des Albumin Promotors aus der Maus und aus *Xenopus* einige Parallelen zu geben. Für den Maus Albumin Promotor konnte weiterhin gezeigt werden, dass ein 2kb großer Enhancer, welcher 10kb von der Transkriptionsstartstelle entfernt liegt essentiell für die Expression in der Leber transgener Mäuse ist (Pinkert et al., 1987).

Ein Promotorkonstrukt, bei dem der Maus Albumin Enhancer mit einem 2kb großem 68 kDa Albumin Promotorfragment fusioniert wurde, zeigte in transgenen *Xenopoden* keinerlei Aktivität (Tabelle 4). Da bei Transfektionsexperimenten von Zelllinien beobachtet werden konnte, dass längere 68kDa Albumin Promotor Fragmente in Hepatozyten nur eine geringe Aktivierung von Reportergen auslösen (Schorpp et al., 1988b), ist es denkbar, dass die Promotoraktivität des Hybrid Promotors ebenfalls runterreguliert ist.

Mit dem Konstrukt Enh-706AlbGFP (Abbildung 10), in dem der Albumin Enhancer zusammen mit einem kurzen Fragment des 68 kDa Albumin Promotors die Expression von GFP steuert, kann eine grüne Fluoreszenz in der Leber transgener Embryonen beobachtet werden (Abbildung 11). Die mit den 68 kDa Albumin Promotor Fragmenten beobachtete Expression von GFP im Schwanz und Kopf der transgenen Larven wurde durch Enh-706AlbGFP nicht vermittelt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der Enhancer für 2 Effekte verantwortlich ist. Zum einen ist er für die Expression des Reportergens in der Leber verantwortlich und zum anderen reprimiert er die artifizielle Aktivität des 68 kDa Albumin Promotorfragmentes.

In Mäusen wurde der Maus Enhancer zusammen mit dem Maus Albumin Promotor eingesetzt, um die Expression von Genen wie der Cre Recombinase in der Leber auszulösen (Yakar et al., 1999). Eine erfolgreiche Fusion des Maus Albumin Enhancer mit dem Albumin Promotor eines niederen Vertebraten wurde jedoch noch nicht durchgeführt.

Aus der Tatsache, dass die 68 kDa Albumin Promotor Fragmente allein nicht in Lage sind eine leberspezifische Expression zu vermitteln kann man schließen, dass der Enhancer ein bedeutendes Element bei der leberspezifischen Aktivierung von Reportergenen darstellt. Um die Kernbestandteile in diesem Promotorelement genau zu lokalisieren, scheint es ein vielversprechender Ansatz zu sein den Enhancer zu verkürzen. Auf diese Weise würde der für die leberspezifische Aktivität verantwortliche Bereich weiter eingegrenzt werden.

Man weiß, dass sich innerhalb des Enhancers ein 830 bp großes Core Element befindet in dem sich insgesamt 11 Protein Bindestellen befinden (Liu et al., 1991). Insbesondere den Bindestellen für HNF3(FoxA) und GATA 4 kommt eine herausragende Bedeutung zu, da diese in endodermalen Zellen als erstes besetzt werden und so der Bindung von anderen Faktoren an den Enhancer vorausgehen. (Cirillo et al., 1998; Bossard and Zaret, 1998; Gualdi et al., 1996). Im zeitlichen Verlauf der Dissertation wurde gezeigt, dass HNF3 β durch seine Bindung das Chromatin öffnet und somit den Zugang für andere Faktoren zu regulatorischen Sequenzen erst ermöglicht (Cirillo et al., 2002).

Ein 428bp großes Fragment aus dem Core Element, welches sowohl die HNF3(FoxA) als auch die GATA 4 Bindestelle enthält haben wir an ein kurzes 68 kDa Albumin Promotorfragment fusioniert. Durch Promotor Reportergen Studien in transgenen Xenopoden kann nun überprüft werden, ob dieses Fragment noch eine leberspezifische Aktivität vermittelt. Ferner könnten dann durch gezielte Mutationen von z.B. der HNF3(FoxA) oder GATA 4 Bindestelle die Kern Elemente identifiziert werden, welche eine Promotoraktivität in der Leber regulieren.

3 Expression transgener Reporter DNA unter Kontrolle des humanen HNF1 α Promotors

Gewebespezifische Promotoren aus Säugetieren wie der Elastase, PDX-1 und Transthyretin Promotor aus der Maus, sowie der tubulin α -1 Promotor aus der Ratte weisen als Transgen in *Xenopus laevis* eine räumlich und zeitlich korrekte Aktivität auf (Beck and Slack, 1999; Marsh-Armstrong et al., 1999). Dies ist ein starkes Argument dafür, dass die wichtigen regulatorischen Promotorelemente über die Spezies hinweg konserviert sind. Aus diesem Grund schien es ein vielversprechender Ansatz zu sein, die endodermale Aktivität des humanen HNF1 α Promotors in transgenen Xenopoden zu untersuchen.

Mit dem Promotor Reporter Gen Konstrukt pCShumHNF1 α GFP (Abbildung 12), bei dem GFP unter der Kontrolle des humanen HNF1 α Promotors exprimiert wird, konnte in keinem der hergestellten Xenopoden eine grüne Fluoreszenz im Endoderm bzw. Mesoderm beobachtet werden (Tabelle 5). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass der humane HNF1 α Promotor im *Xenopus* System keine Aktivierung des Reporter gens GFP vermittelt. Dies bedeutet, dass sich der humane HNF1 α Promotor für Promotor Reporter Gen Studien in transgenen Xenopoden nicht eignet. Dass es sich bei dem verwendeten 6kb großen humanen HNF1 α Promotor um ein zu kurzes Promotorfragment handelt ist relativ unwahrscheinlich, da bereits gezeigt wurde, dass 6kb des HNF1 α Promotors aus *Xenopus* ausreichen, um eine gewebespezifische Reporter Gen Expression in transgenen Xenopoden zu vermitteln (Ryffel and Lingott, 2000).

4 20bp im 3` Bereich des HNF1 α Promotors aus *Xenopus laevis* sind notwendig für seine endodermale Aktivität

Es ist bekannt, dass durch eine Deletion des 3` Bereiches von -58bp bis -207bp im *Xenopus* Promotor von HNF1 α , die Aktivität des Promotors in endodermalen Geweben transgener Xenopoden ausgelöscht wird (Ryffel and Lingott, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Bereich durch die Analyse von HNF1 α Promotor Deletionskonstrukten in transgenen *Xenopus* Embryonen weiter eingegrenzt werden.

Die Promotor Reportergen Konstrukte -4kb/-173HNF1 α GFP und -4kb/-110HNF1 α GFP vermittelten keine Aktivität im Endoderm transgener Xenopoden, wohingegen das -4kb/-90HNF1 α GFP Konstrukt im Endoderm von 29% der transgenen Embryos aktiv war (Abbildung 17). Hieraus kann man schließen, dass das HNF1 α Promotorfragment bis -90bp die Elemente beinhaltet, welche für die Promotoraktivität von HNF1 α im Endoderm von *Xenopus* essentiell sind. Im Gegensatz dazu scheint das 20bp kürzere HNF1 α Promotorfragment bis -110bp die für die endodermale Aktivität wichtigen Elemente nicht mehr zu enthalten. Dies zeigt, dass die 20bp von -90 bis -110 eine bedeutende Rolle bei der Regulierung der endodermalen Promotoraktivität von HNF1 α spielen. Betrachtet man diesen Promotorbereich im Detail, so fällt ein Sequenzmotiv von 4 Thymins gefolgt von 7 Guanins (TG-Motiv) innerhalb dieser 20bp auf (Abbildung 18). Interessanterweise ist ein identisches Sequenzmotiv ebenfalls im 3' Bereich des humanen HNF1 α Promotors lokalisiert (Abbildung 18), was ein Hinweis auf die Wichtigkeit dieses Sequenzbereiches ist.

Bei vielen Promotoren wird die Aktivität durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische Bindestellen innerhalb der Promotorsequenz vermittelt. Auf diese Weise wird die Expression des entsprechenden Gens auf der Ebene der Transkription kontrolliert. Eine Überprüfung in der Datenbank Transfac® 6.0-Public zeigte, dass weder das TG-Motiv, noch die gesamten 20bp eine bekannte Bindestelle für DNA bindende Proteine repräsentieren. Eine Regulation der Transkription durch die Bindung eines Transkriptionsfaktors an diese Promotorsequenz scheint somit unwahrscheinlich. Da die Transkriptionsstartstelle im HNF1 α Promotor sich bei -216 bp befindet, liegt der Sequenzabschnitt von -110 bis -90 bereits im transkribierten Bereich. Aus diesem Grunde wäre es denkbar, dass diese Region die Expression des Gens nach der Transkription beeinflusst. Denkbar wäre hier eine Inhibition der Translation durch RNA bindende Proteine (Lasko, 2003), oder durch „*Antisense*“ RNA (Good, 2003; Kumar and Carmichael, 1998).

Auffällig ist auch, dass die mesodermale Aktivität bei allen HNF1 α Promotorfragmenten vorhanden ist. Dabei scheint es keinen Unterschied zu machen, ob die für die endodermale Aktivität wichtigen 20bp in den Fragmenten vorhanden sind oder nicht. Dies ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass der 20bp Bereich speziell für die endodermale Aktivität des HNF1 α Promotors von elementarer Bedeutung ist und auf das mesodermale Aktivierungspotential des Promotors keinen Einfluss hat.

5 Eine MODY3 assoziierte Mutation im TG Motiv des Xenopus HNF1 α Promotors hat keinen Einfluss auf seine Aktivität im Endoderm

Aufgrund der Konservierung des TG-Motivs zwischen Mensch und Xenopus, sowie der mit den Deletionskonstrukten gewonnenen Ergebnisse wurde vermutet, dass das TG-Motiv von Bedeutung für die endodermale Promotoraktivität des HNF1 α Promotors ist.

Aus Untersuchungen des humanen HNF1 α Gens ist bekannt, dass Mutationen des HNF1 α Gens im Menschen zu MODY3 einem autosomal dominant vererbten Insulin unabhängigen Jugenddiabetes mellitus führen (Hattersley, 1998; Froguel and Velho, 1999; Winter et al., 1999; Winter and Silverstein, 2000; Ryffel, 2001). Neben den Mutationen im HNF1 α Gen wurden in MODY3 Patienten aber auch Sequenzveränderungen im HNF1 α Promotor detektiert (Gagnoli et al., 1997; Godart et al., 2000; Yoshiuchi et al., 1999). Eine mit MODY3 assoziierte Sequenzveränderung 283A-G ist in der HNF4 Bindestelle des humanen Promotors lokalisiert (Godart et al., 2000). Bei Promotor Reportergen Analysen in transgenen Xenopoden führte eine Mutation der HNF4 Bindestelle im HNF1 α Promotor von Xenopus zu einer Auslöschung der Reportergen Expression im Pronephros (Ryffel and Lingott, 2000). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die assoziierte Sequenzveränderung 283A-G eine Mutation darstellt und einen Einfluss auf die MODY3 Erkrankung hat. Dennoch stellt sich die Frage, ob alle gefundenen Sequenzveränderungen funktionsverändernde Mutationen darstellen, welche einen Einfluss auf die Aktivität des Promotors haben, oder ob es sich um Polymorphismen handelt, welche die Aktivität von HNF1 α nicht beeinflussen.

Interessanterweise sind 3 solcher MODY3 assoziierten Sequenzveränderungen im humanen HNF1 α Promotor innerhalb des TG-Motivs identifiziert worden (Yoshiuchi et al., 1999; Godart et al., 2000). Die Häufung der MODY3 assoziierten Sequenzveränderungen in diesem Sequenzmotiv könnte darauf hinweisen, dass es sich bei diesem Sequenzmotiv um ein wichtiges regulatorisches Promotorelement handelt. Aus diesem Grunde wurde in dem HNF1 α Promotor aus Xenopus ein Guanin des TG-Motivs deletiert. Dies entspricht der -119Gdel Sequenzveränderung im humanen Promotor. Fusioniert mit GFP vermittelte dieser Promotor eine Expression von GFP im Endoderm von 57% der transgenen Tiere. 100% der transgenen Frösche zeigten einen GFP positiven Pronephros (Abbildung 21). Das Aktivitätsprofil des Wildtyp HNF1 α Promotors, weist eine endodermale Promotoraktivität in 61% der transgenen Tiere auf (Abbildung 21). Vergleicht man die Aktivitäten der beiden Promotoren im Endoderm wird deutlich, dass der Wildtyp HNF1 α Promotor und der HNF1 α

Promotor mit der Deletion im TG-Motiv ein identisches Aktivierungspotential für die Expression von Reportergenen im Endoderm von *Xenopus* haben. Daraus geht hervor, dass eine Deletion im TG-Motiv die Promotoraktivität des HNF1 α Promotors im Endoderm von *Xenopus* nicht beeinflusst.

Die eingeführte Deletion entspricht einer MODY3 assoziierten Sequenzveränderung im humanen HNF1 α Promotor. Die im transgenen *Xenopus* gewonnenen Ergebnisse scheinen nun darauf hinzudeuten, dass es sich bei dieser Sequenzveränderung um einen Polymorphismus handelt der keinen Einfluss auf die Expression von HNF1 α hat. Die Aktivität des HNF1 α Promotors in den einzelnen endodermalen Zelltypen wie z.B. den β -Zellen des Pankreas wurde nicht explizit analysiert. Somit ist nicht ausgeschlossen, dass es sich bei der MODY3 assoziierten Sequenzveränderung -119Gdel um eine funktionsverändernde Mutation handelt, welche die Aktivität des HNF1 α Gens in einzelnen Zelltypen beeinflusst. Ein weiteres Argument dafür ist die Tatsache, dass diese Sequenzveränderung im HNF1 α Promotor bei 4 MODY3 Patienten einer Familie identifiziert werden konnte (Godart et al., 2000). In dieser Familie wurde die Sequenzveränderung zusammen mit der MODY3 Erkrankung über drei Generationen vererbt. Diese Korrelation von Sequenzveränderung und Erkrankung lässt sich als Hinweis deuten, dass zwischen beiden ein kausaler Zusammenhang besteht. Dies ist jedoch kein sicherer Beweis dafür, dass die Sequenzveränderung -119Gdel MODY3 verursacht. Es ist vielmehr ebenso gut möglich, dass ein anderes Gen als HNF1 α mutiert ist und so MODY verursacht. Wenn sich HNF1 α auf demselben Chromosom in der Umgebung dieses Gens befindet, würde es zusammen mit diesem Gen weitervererbt werden. Die -119G Deletion wäre dann ein Marker jedoch kein Verursacher der MODY Erkrankung. Denkbar wäre auch, dass die funktionsverändernde Mutation an einer anderen Stelle im HNF1 α Gen vorliegt. Auch in diesem Falle wäre die -119G Deletion ein Marker, jedoch kein Auslöser der MODY Erkrankung.

6 Analyse des *Xenopus* HNF1 α Promotors in Säugerzelllinien

Das Potential verschieden langer HNF1 α Promotorfragmente, das Reportergen Luciferase in den Hepatomazelllinien FT02B und HepG2 zu aktivieren wurde untersucht. Die Transfektionen dieser Promoter Reportergen Konstrukte in FT02B Zellen spiegelte nicht die

im transgenen Tier gewonnenen Ergebnisse wider. So zeigte z.B. das Fragment (-594/-90) in dem das TG-Motiv enthalten ist, gegenüber (-594/-58) eine reduzierte Aktivität, wohingegen das HNF1 α Promotorfragment (-594/-110) dem die TG Sequenz fehlt, eine deutlich gesteigerte Expression des Reportergens vermittelt (Abbildung 22). In HepG2 Zellen ist die durch die einzelnen HNF1 α Promotor Reportergen Konstrukte vermittelte Luciferaseaktivität auf einem gleichbleibenden Niveau. Es lässt sich zwischen den verschieden langen HNF1 α Promotorfragmenten keinerlei signifikante Veränderung in den Aktivierungspotentialen feststellen (Abbildung 23). Auch diese Daten lassen sich nicht in Übereinstimmung bringen mit den Ergebnissen der transgenen Studien. Aus diesen Gründen wird klar, dass sich Transfektionsexperimente in Säugerzellen nicht dafür eignen, den HNF1 α Promotor aus *Xenopus* hinsichtlich seiner endodermalen Aktivität zu analysieren.

7 Die Bedeutung von Promotorstudien in transgenen Xenopoden

In dieser Arbeit wurden gewebespezifische Promotoren durch Promotor Reportergen Assays funktionell analysiert. Diese Analysen wurden durch die Etablierung der transgenen Technik in *Xenopus laevis* ermöglicht (Kroll and Amaya, 1996; Huang et al., 1999).

Eine ganze Reihe von gewebespezifischen Promotoren wie der Insulin (Dandoy-Dron et al., 1995; Dandoy-Dron et al., 1991), myoD (Goldhamer et al., 1992), Telokin (Smith et al., 1998) oder Hmga2 (Schiltz et al., 2003) um nur einige zu nennen, wurden als Promotor Reportergen Konstrukte erfolgreich in transgene Mäuse eingebracht. Bei vielen dieser Promotoren wurde nicht oder nur in Ansätzen analysiert, was die Elemente innerhalb des Promotors sind, die die Gewebespezifität vermitteln.

Dies liegt aller Wahrscheinlichkeit nach in dem Aufwand begründet, der mit der Herstellung transgener Linien verbunden ist. Da die Identifikation gewebespezifisch essentieller Elemente eines Promotors die funktionelle Analyse zahlreicher Promotorkonstrukte erfordert, würde sich dies im Mausmodell nur mit einem großen technischen und zeitlichen Aufwand bewerkstelligen lassen. Die Haltung der vielen Mäuse würde in der Regel zu enormen logistischen Problemen führen. Aus diesen Gründen eignet sich das Maus Modellsystem nicht besonders gut für die Durchführung umfangreicher Promotor Reportergen Studien.

Im Gegensatz dazu lassen sich transgene Xenopoden mit einem recht überschaubarem Arbeitsaufwand herstellen. An einem optimalen Injektionstag lassen sich über 10 transgene

Embryonen herstellen. Man sollte jedoch nicht unbeachtet lassen, dass bei dieser Technik die Qualität der Eier in hohem Maße einen Einfluss darauf hat, wie viele transgene Xenopoden erzeugt werden und sich entwickeln. Werden Eier von niedriger Qualität injiziert, so kann dies dazu führen, dass sich aus mehreren Tausend injizierten Eiern kein einziger transgener Embryo entwickelt.

Da das Promotor Reportergen Konstrukt an einer zufälligen Stelle ins Genom integriert wird, stellt jeder transgene Xenopus Embryo eine unabhängige transgene Linie dar. Ein weiterer Vorteil des Xenopus Systems kommt bei der Analyse der Tiere zur Geltung. Da die Larven sich außerhalb des Muttertiers entwickeln und transparent sind, lassen sich die Expression der Reportergene (in dieser Arbeit GFP) durch einfache Beobachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop analysieren. Weniger geeignet für diese Anwendung sind Reportergene, wie Luciferase, LacZ oder CAT, da sie durch eine enzymatische Reaktion nachgewiesen werden und sich die Expression somit nicht einfach am lebenden Embryo beobachten lässt.

Durch die Verwendung des Reporters GFP kann ein Tier über alle frühen Entwicklungsstadien hinweg kontinuierlich analysiert werden. Eine Tötung des Embryos wie im Maus System ist bei Xenopus nicht nötig. Diese Methode eröffnet somit die Möglichkeit, in einem vernünftigen Zeitrahmen umfangreiche Promotorstudien in transgenen Tieren durchzuführen.

Dass sich diese Technik für die Analyse verschiedenster Promotoren hervorragend eignet, zeigen nicht zuletzt die vielen Publikationen seit der Etablierung dieser Technik im Jahre 1996. So wurde gezeigt, dass der Promotor des N- β -Tubulin, Aktin (CAR) (Kroll and Amaya, 1996), Keratin (Marsh-Armstrong et al., 1999), Prph2 (Moritz et al., 2002) und Rhodopsin (Knox et al., 1998) Gens aus Xenopus, sowie der Elastase, PDX-1 und Transthyretin Promotor aus der Maus (Beck and Slack, 1999), und der tubulin α -1 Promotor aus der Ratte (Marsh-Armstrong et al., 1999) eine räumlich und zeitlich korrekte Aktivität in transgenen Xenopoden zeigen. Es wurde für diese Promotoren jedoch keine Kartierung durchgeführt, oder bestimmt welche Regionen innerhalb des Promotors für die Gewebespezifität verantwortlich sind. Boatright et al. (2001) zeigte dass Fragmente des IRBP Promotors von -1783/+101 und -156/+101 eine gewebespezifische Aktivität in der Retina vermitteln, wohingegen bei einem IRBP Promotorfragment von -70/+101 diese Spezifität ausgelöscht ist (Boatright et al., 2001). Was in diesem Bereich verantwortlich für die Retina spezifische Aktivität ist wurde jedoch nicht untersucht. Asahi et al. zeigte kürzlich, dass ein 3kb, 1,8kb und 0,3kb großes Fragment des FTZ-F1 α Promotors eine gewebespezifische Aktivität in

transgenen Xenopoden vermitteln und dass an das 0,3kb Fragment 2 Proteine binden (Asahi et al., 2002). Um welche Proteine es sich hierbei handelt und ob die Bindung dieser Proteine einen Einfluss auf die Aktivität hat wurde nicht analysiert.

Im Vergleich dazu konnte ich in meinen Promotor Reportergen Analysen erfolgreich die pankreasspezifische Aktivität des PDX-1 Promotors ausschalten. Ich zeigte, dass der Maus Albumin Enhancer Speziesübergreifend eine korrekte Aktivität vermittelt und konnte im HNF1 α Promotor eine 20bp Region identifizieren, welche essentiell für die endodermale Aktivität des HNF1 α Promotors ist.

Wichtige Promotor Bereiche wurden im Falle des Xnr-1 und Bix4 Promotors entdeckt. Es konnten durch Mutationen von T-Box Bindestellen im Xnr1 und Bix4 Promotor gezeigt werden, dass diese notwendig für die Aktivierung der Promotoren durch VegT sind (Hyde and Old, 2000; Casey et al., 1999). Tanaka et al. zeigte kürzlich dass der Cyclin D1 Promotor eine intakte TCF/LEF Bindestelle benötigt, um eine Expression in der Neuralplatte zu vermitteln (Tanaka et al., 2003). Ryffel et al. (2000) konnte zeigen, dass eine Mutation der HNF4 Bindestelle im HNF1 α Promotor die Aktivität des Promotors im Pronephros auslöscht, wohingegen durch eine Deletion von -58/-207 die endodermale Aktivität des Promotors zerstört ist (Ryffel and Lingott, 2000).

Durch umfangreiche Promotoranalysen konnte gezeigt werden, dass im ANF Promotors eine Bindestelle für Nkx2-5 und GATA-4 für eine korrekte Aktivität benötigt werden (Small and Krieg, 2003). Im Xtmyf Promotor wurde HBX2 als ein Element identifiziert, dass sowohl für die Aktivierung als auch die Reprimierung der Xtmyf Expression essentiell ist (Polli and Amaya, 2002).

Im Falle des Xbra Promotors konnte Lerchner et al. (2000) durch transgene Promotor Reportergen Studien zeigen, dass eine Bindestelle für SIP1 (Smad interacting protein) für die Aktivität des Promotors während der Gastrulation in der marginalen Zone essentiell ist. Eine zweite Region, in der zwei Homeodomän Bindestellen lokalisiert sind, ist für die Repression der Aktivität im dorsalen Mesoderm und Ectoderm in den Gastrula Stadien verantwortlich. Eine dritte Region im weiteren „*upstream*“ Promotor ist notwendig für die Repression der Aktivität in neuralem Gewebe späterer Entwicklungsstadien (Lerchner et al., 2000).

8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität von Promotoren in endodermalen Geweben transgener *Xenopus* Embryonen untersucht. Es wurden die Promotoren des PDX-1, des 68kDa Albumin und des HNF1 α Gens analysiert.

Durch Promotor Reporter Gen Analysen konnte gezeigt werden, dass der PDX-1 Promotor aus der Maus, die Expression des Reportergens GFP im Pankreas der transgenen Embryonen vermittelt. Durch die Deletion eines 1kb großen Bereiches innerhalb des PDX-1 Promotors wurde die Aktivität des Promotors im Pankreas transgener Xenopoden ausgelöscht. So konnte erfolgreich gezeigt werden, dass dieser Bereich für die Aktivität des PDX-1 Promotors im Pankreas transgener Xenopoden essentiell ist.

Albumin wird in Vertebraten ausschließlich in der Leber exprimiert. Promotor Reporter Gen Assays in transgenen *Xenopus* Embryonen zeigten, dass Fragmente des 68kDa Albumin Promotors bis zu einer Länge von 4,2 kb nicht ausreichen, um eine leberspezifische Expression zu vermitteln. Stattdessen zeigen die 68kDa Albumin Promotorfragmente eine spezifische, jedoch artifizielle Aktivität in Zellen des Schwanzes und Kopfes transgener Larven. Durch die Fusion des Maus Albumin Enhancers an ein 68kDa Albumin Promotorfragment gelang es eine Reporter Gen Expression von GFP in der Leber transgener Xenopoden auszulösen. Gleichzeitig wurde die artifizielle Aktivität des 68kDa Albumin Promotorfragments unterdrückt. Dies beweist, dass es sich bei dem Maus Albumin Enhancer um ein wichtiges Element handelt, welches auch im niederen Vertebraten *Xenopus laevis* eine leberspezifische Aktivität vermittelt.

Der humane HNF1 α Promotor vermittelt in transgenen Embryonen keine Expression des Reportergens GFP. Dies bedeutet, dass der humane HNF1 α Promotor ungeeignet für Promotor Reporter Gen Studien in transgenen Xenopoden ist.

Im Falle des HNF1 α Promotor aus *Xenopus laevis* konnte durch Promotor Reporter Gen Studien in transgenen Xenopoden ein 20bp langer Sequenzabschnitt identifiziert werden, welcher notwendig für die endodermale Aktivität des HNF1 α Promotors ist. Innerhalb dieses Abschnittes wurde ein TG Sequenzmotiv als mögliches regulatorisches Element identifiziert. Die Deletion eines Nukleotids in diesem TG Motiv, welche einer MODY3 assoziierten Sequenzveränderung im humanen HNF1 α Promotor entspricht, beeinflusst die endodermale Aktivität des HNF1 α Promotors jedoch nicht.

V. Literatur

Ahlgren,U., Jonsson,J., and Edlund,H. (1996). The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* 122, 1409-1416.

Arents,G., Burlingame,R.W., Wang,B.C., Love,W.E., and Moudrianakis,E.N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 10148-10152.

Asahi,H., Takase,M., Yuge,M., Matsui,K., Mori,M., Fujita,T., and Nakamura,M. (2002). Expression of FTZ-F1 α in transgenic *Xenopus* embryos and oocytes. *Dev. Growth Differ.* 2002. Dec. ;44. (6.):509. -16. 44, 509-516.

Bach,I., Galcheva-Gargova,Z., Mattei,M.G., Simon-Chazottes,D., Guenet,J.L., Cereghini,S., and Yaniv,M. (1990). Cloning of human hepatic nuclear factor 1 (HNF1) and chromosomal localization of its gene in man and mouse. *Genomics* 8, 155-164.

Bach,I., Mattei,M.G., Cereghini,S., and Yaniv,M. (1991). Two members of an HNF1 homeoprotein family are expressed in human liver. *Nucleic. Acids. Res.* 19, 3553-3559.

Bartkowski,S., Zapp,D., Weber,H., Eberle,G., Zoidl,C., Senkel,S., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (1993). Developmental regulation and tissue distribution of the liver transcription factor LFB1 (HNF1) in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* 13, 421-431.

Baumhueter,S., Mendel,D.B., Conley,P.B., Kuo,C.J., Turk,C., Graves,M.K., Edwards,C.A., Courtois,G., and Crabtree,G.R. (1990). HNF-1 shares three sequence motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and APF. *Genes Dev.* 4, 372-379.

Beck,C.W. and Slack,J.M. (1999). Gut specific expression using mammalian promoters in transgenic *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 88, 221-227.

Belanger,L., Roy,S., and Allard,D. (1994). New albumin gene 3' adjacent to the α 1-fetoprotein locus. *J. Biol. Chem.* 269, 5481-5484.

Bisbee,C.A., Baker,M.A., Wilson,A.C., Haji-Azimi,I., and Fischberg,M. (1977). Albumin phylogeny for clawed frogs (*Xenopus*). *Science* 195, 785-787.

Blumenfeld,M., Maury,M., Chouard,T., Yaniv,M., and Condamine,H. (1991). Hepatic nuclear factor 1 (HNF1) shows a wider distribution than products of its known target genes in developing mouse. *Development* 113, 589-599.

Boatright,J.H., Knox,B.E., Jones,K.M., Stodulkova,E., Nguyen,H.T., Padove,S.A., Borst,D.E., and Nickerson,J.M. (2001). Evidence of a tissue-restricting DNA regulatory element in the mouse IRBP promoter. *FEBS Lett.* 504, 27-30.

Bossard,P. and Zaret,K.S. (1998). GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development* 125, 4909-4917.

- Bretherton-Watt,D., Gore,N., and Boam,D.S. (1996). Insulin upstream factor 1 and a novel ubiquitous factor bind to the human islet amyloid polypeptide/amylin gene promoter. *Biochem. J.* *313* (Pt 2), 495-502.
- Broceno,C., Walsh,K., and Pons,G. (1999). A 1.3-kb upstream 5' region of the rat phosphoglycerate mutase m gene confers testis and skeletal muscle-specific expression in transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *263*, 244-250.
- Bronchain,O.J., Hartley,K.O., and Amaya,E. (1999). A gene trap approach in *Xenopus*. *Curr. Biol.* *9*, 1195-1198.
- Burke,T.W. and Kadonaga,J.T. (1996). *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev.* *10*, 711-724.
- Carty,M.D., Lillquist,J.S., Peshavaria,M., Stein,R., and Soeller,W.C. (1997). Identification of cis- and trans-active factors regulating human islet amyloid polypeptide gene expression in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 11986-11993.
- Casey,E.S., Tada,M., Fairclough,L., Wylie,C.C., Heasman,J., and Smith,J.C. (1999). Bix4 is activated directly by VegT and mediates endoderm formation in *Xenopus* development. *Development* *126*, 4193-4200.
- Cereghini,S. (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* *10*, 267-282.
- Cereghini,S., Raymondjean,M., Carranca,A.G., Herbomel,P., and Yaniv,M. (1987). Factors involved in control of tissue-specific expression of albumin gene. *Cell* *50*, 627-638.
- Chouard,T., Blumenfeld,M., Bach,I., Vandekerckhove,J., Cereghini,S., and Yaniv,M. (1990). A distal dimerization domain is essential for DNA-binding by the atypical HNF1 homeodomain. *Nucleic. Acids. Res.* *18*, 5853-5863.
- Cirillo,L.A., Lin,F.R., Cuesta,I., Friedman,D., Jarnik,M., and Zaret,K.S. (2002). Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol. Cell* *9*, 279-289.
- Cirillo,L.A., Mcpherson,C.E., Bossard,P., Stevens,K., Cherian,S., Shim,E.Y., Clark,K.L., Burley,S.K., and Zaret,K.S. (1998). Binding of the winged-helix transcription factor HNF3 to a linker histone site on the nucleosome. *EMBO J.* *17*, 244-254.
- Cox,R.D., Southam,L., Hashim,Y., Horton,V., Mehta,Z., Taghavi,J., Lathrop,M., and Turner,R. (1999). UKPDS 31: Hepatocyte nuclear factor-1alpha (the MODY3 gene) mutations in late onset Type II diabetic patients in the United Kingdom. United Kingdom prospective diabetes study. *Diabetologia* *42*, 120-121.
- Dandoy-Dron,F., Itier,J.M., Monthioux,E., Bucchini,D., and Jami,J. (1995). Tissue-specific expression of the rat insulin 1 gene in vivo requires both the enhancer and promoter regions. *Differentiation* *58*, 291-295.
- Dandoy-Dron,F., Monthioux,E., Jami,J., and Bucchini,D. (1991). Regulatory regions of rat insulin I gene necessary for expression in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* *19*, 4925-4930.

- Danilchick,M., Peng,H.B., and Kay,B.K. (1991). *Xenopus laevis*: Practical uses in cell and molecular biology. Pictorial collage of embryonic stages. *Methods Cell Biol.* 36:679-81., 679-681.
- Darnell,J.E., Jr. (1985). *RNA.* *Sci. Am.* 253, 68-78.
- De Simone,V., De Magistris,L., Lazzaro,D., Gerstner,J., Monaci,P., Nicosia,A., and Cortese,R. (1991). LFB3, a heterodimer-forming homeoprotein of the LFB1 family, is expressed in specialized epithelia. *EMBO J.* 10, 1435-1443.
- De,S., V and Cortese,R. (1991). Transcriptional regulation of liver-specific gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 960-965.
- Deryckere,F., Byrnes,L., Wagner,A., McMorrow,T., and Gannon,F. (1995). Salmon HNF1: cDNA sequence, evolution, tissue specificity and binding to the salmon serum albumin promoter. *J. Mol. Biol.* 247, 1-10.
- Dynan,W.S. and Tjian,R. (1985). Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature* 316, 774-778.
- Edlund,H. (1998). Transcribing pancreas. *Diabetes* 47, 1817-1823.
- Finney,M. (1990). The homeodomain of the transcription factor LF-B1 has a 21 amino acid loop between helix 2 and helix 3. *Cell* 60, 5-6.
- Frain,M., Swart,G., Monaci,P., Nicosia,A., Stampfli,S., Frank,R., and Cortese,R. (1989). The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain. *Cell* 59, 145-157.
- Froguel,P. and Velho,G. (1999). Molecular genetics of maturity-onset diabetes of the young. *Trends Endocrinol. Metab.* 10, 142-146.
- Gerrish,K., Cissell,M.A., and Stein,R. (2001). The Role of Hepatic Nuclear Factor 1alpha and PDX-1 in Transcriptional Regulation of the pdx-1 Gene. *J. Biol. Chem.* 276, 47775-47784.
- Gerrish,K., Gannon,M., Shih,D., Henderson,E., Stoffel,M., Wright,C.V., and Stein,R. (2000). Pancreatic beta cell-specific transcription of the pdx-1 gene. The role of conserved upstream control regions and their hepatic nuclear factor 3beta sites. *J. Biol. Chem.* 275, 3485-3492.
- Godart,F., Bellanne-Chantelot,C., Clauin,S., Gragnoli,C., Abderrahmani,A., Blanche,H., Boutin,P., Chevre,J.C., Froguel,P., and Bailleul,B. (2000). Identification of seven novel nucleotide variants in the hepatocyte nuclear factor-1alpha (TCF1) promoter region in MODY patients. *Hum. Mutat.* 15, 173-180.
- Goldhamer,D.J., Faerman,A., Shani,M., and Emerson,C.P., Jr. (1992). Regulatory elements that control the lineage-specific expression of myoD. *Science* 256, 538-542.
- Good,L. (2003). Translation repression by antisense sequences. *Cell Mol. Life Sci.* 2003. May. ;60. (5):854. -61. 60, 854-861.
- Gorski,K., Carneiro,M., and Schibler,U. (1986). Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter. *Cell* 47, 767-776.

- Gragnoli,C., Lindner,T., Cockburn,B.N., Kaisaki,P.J., Gragnoli,F., Marozzi,G., and Bell,G.I. (1997). Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene. *Diabetes* 46, 1648-1651.
- Greenblatt,J. (1991). RNA polymerase-associated transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* 16, 408-411.
- Grunstein,M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349-352.
- Gualdi,R., Bossard,P., Zheng,M., Hamada,Y., Coleman,J.R., and Zaret,K.S. (1996). Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev.* 10, 1670-1682.
- Guz,Y., Montminy,M.R., Stein,R., Leonard,J., Gamer,L.W., Wright,C.V., and Teitelman,G. (1995). Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* 121, 11-18.
- Hamalainen,T., Poutanen,M., and Huhtaniemi,I. (1999). Age- and sex-specific promoter function of a 2-kilobase 5'-flanking sequence of the murine luteinizing hormone receptor gene in transgenic mice. *Endocrinology* 140, 5322-5329.
- Harrison,K.A., Thaler,J., Pfaff,S.L., Gu,H., and Kehrl,J.H. (1999). Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlxb9-deficient mice. *Nat. Genet.* 23, 71-75.
- Hattersley,A.T. (1998). Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. *Diabet. Med.* 15, 15-24.
- Heard,J.M., Herbolme,P., Ott,M.O., Mottura-Rollier,A., Weiss,M., and Yaniv,M. (1987). Determinants of rat albumin promoter tissue specificity analyzed by an improved transient expression system. *Mol. Cell Biol.* 7, 2425-2434.
- Heasman,J. (1997). Patterning the *Xenopus* blastula. *Development* 124, 4179-4191.
- Hendzel,M.J., Wei,Y., Mancini,M.A., Van Hooser,A., Ranalli,T., Brinkley,B.R., Bazett-Jones,D.P., and Allis,C.D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348-360.
- Holewa,B., Pogge v.Strandmann,E., Zapp,D., Lorenz,P., and Ryffel,G.U. (1996). Transcriptional hierarchy in *Xenopus* embryogenesis: HNF4 a maternal factor involved in the developmental activation of the gene encoding the tissue specific transcription factor HNF1 alpha (LFB1). *Mech. Dev.* 54, 45-57.
- Huang,H. and Brown,D.D. (2000). Prolactin is not a juvenile hormone in *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 195-199.
- Huang,H., Marsh-Armstrong,N., and Brown,D.D. (1999). Metamorphosis is inhibited in transgenic *Xenopus laevis* tadpoles that overexpress type III deiodinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 962-967.

- Hyde,C.E. and Old,R.W. (2000). Regulation of the early expression of the *Xenopus* nodal-related 1 gene, *Xnr1*. *Development* 127, 1221-1229.
- Ikawa,M., Yamada,S., Nakanishi,T., and Okabe,M. (1999). Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.* 44:1-20, 1-20.
- Jensen,J., Serup,P., Karlsen,C., Nielsen,T.F., and Madsen,O.D. (1996). mRNA profiling of rat islet tumors reveals *nkx 6.1* as a beta-cell-specific homeodomain transcription factor. *J. Biol. Chem.* 271, 18749-18758.
- Jonsson,J., Carlsson,L., Edlund,T., and Edlund,H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371, 606-609.
- Kass,S.U., Landsberger,N., and Wolffe,A.P. (1997a). DNA methylation directs a time dependent repression of transcription initiation. *Curr. Biol.* 7, 157-165.
- Kass,S.U., Pruss,D., and Wolffe,A.P. (1997b). How does DNA methylation repress transcription?. *Trends. Genet.* 13, 444-449.
- Klein-Hitpass,L., Schorpp,M., Wagner,U., and Ryffel,G.U. (1986). An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus* vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. *Cell* 46, 1053-1061.
- Knox,B.E., Schlueter,C., Sanger,B.M., Green,C.B., and Besharse,J.C. (1998). Transgene expression in *Xenopus* rods. *FEBS Lett.* 423, 117-121.
- Kroll,K.L. and Amaya,E. (1996). Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* 122, 3173-3183.
- Kroll,K.L. and Gerhart,J.C. (1994). Transgenic *X. laevis* embryos from eggs transplanted with nuclei of transfected cultured cells. *Science* 266, 650-653.
- Kumar,M. and Carmichael,G.G. (1998). Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1415-1434.
- Kuo,C.J., Conley,P.B., Hsieh,C.L., Francke,U., and Crabtree,G.R. (1990). Molecular cloning, functional expression, and chromosomal localization of mouse hepatocyte nuclear factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9838-9842.
- Lasko,P. (2003). Gene regulation at the RNA layer: RNA binding proteins in intercellular signaling networks. *Sci. STKE.* 2003. Apr 22. ;2003. (179.):RE6. 2003, RE6.
- Lausen,J., Thomas,H., Lemm,I., Bulman,M., Borgschulze,M., Lingott,A., Hattersley,A.T., and Ryffel,G.U. (2000). Naturally occurring mutations in the human *HNF4alpha* gene impair the function of the transcription factor to a varying degree. *Nucleic Acids Res.* 28, 430-437.
- Lehto,M., Wipemo,C., Ivarsson,S., Lindgren,C., Lipsanen-Nyman,M., Weng,J., Wibell,L., Wid, Tuomi,T., and Groop,L. (1999). High frequency of mutations in *MODY* and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. *Diabetologia* 42, 1131-1137.

- Leonard,J., Peers,B., Johnson,T., Ferreri,K., Lee,S., and Montminy,M.R. (1993). Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Mol. Endocrinol.* 7, 1275-1283.
- Lerchner,W., Latinkic,B.V., Remacle,J.E., Huylebroeck,D., and Smith,J.C. (2000). Region-specific activation of the *Xenopus* Brachyury promoter involves active repression in ectoderm and endoderm: a study using transgenic frog embryos. *Development* 127, 2729-2739.
- Levine,A.J., Munoz-Sanjuan,I., Bell,E., North,A.J., and Brivanlou,A.H. (2003). Fluorescent labeling of endothelial cells allows in vivo, continuous characterization of the vascular development of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 254, 50-67.
- Li,H., Arber,S., Jessell,T.M., and Edlund,H. (1999). Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene *Hlxb9*. *Nat. Genet.* 23, 67-70.
- Lichtsteiner,S. and Schibler,U. (1989). A glycosylated liver-specific transcription factor stimulates transcription of the albumin gene. *Cell* 57, 1179-1187.
- Liu,J.K., DiPersio,C.M., and Zaret,K.S. (1991). Extracellular signals that regulate liver transcription factors during hepatic differentiation in vitro. *Mol. Cell Biol.* 11, 773-784.
- Luger,K., Mader,A.W., Richmond,R.K., Sargent,D.F., and Richmond,T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution [see comments]. *Nature* 389, 251-260.
- Maire,P., Wuarin,J., and Schibler,U. (1989). The role of cis-acting promoter elements in tissue-specific albumin gene expression. *Science* 244, 343-346.
- Mani,S.S., Besharse,J.C., and Knox,B.E. (1999). Immediate upstream sequence of arrestin directs rod-specific expression in *Xenopus*. *J. Biol. Chem.* 274, 15590-15597.
- Maniatis,T., Goodbourn,S., and Fischer,J.A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 236, 1237-1245.
- Marsh-Armstrong,N., Huang,H., Berry,D.L., and Brown,D.D. (1999a). Germ-line transmission of transgenes in *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 14389-14393.
- Marsh-Armstrong,N., Huang,H., Remo,B.F., Liu,T.T., and Brown,D.D. (1999b). Asymmetric growth and development of the *Xenopus laevis* retina during metamorphosis is controlled by type III deiodinase. *Neuron* 24, 871-878.
- Marshak,S., Benshushan,E., Shoshkes,M., Havin,L., Cerasi,E., and Melloul,D. (2000). Functional conservation of regulatory elements in the *pdx-1* gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3 β transcription factors mediate beta-cell-specific expression [In Process Citation]. *Mol. Cell Biol.* 20, 7583-7590.
- McKnight,S. and Tjian,R. (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 46, 795-805.
- Miller,C.P., McGehee,R.E., Jr., and Habener,J.F. (1994). IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *EMBO J.* 13, 1145-1156.

- Mitchell,P.J. and Tjian,R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* *245*, 371-378.
- Moritz,O.L., Peck,A., and Tam,B.M. (2002). *Xenopus laevis* red cone opsin and *Prph2* promoters allow transgene expression in amphibian cones, or both rods and cones. *Gene* *298*, 173-182.
- Nastos,A., Pogge v.Strandmann,E., Weber,H., and Ryffel,G.U. (1998). The embryonic expression of the tissue-specific transcription factor HNF1alpha in *Xenopus*: rapid activation by HNF4 and delayed induction by mesoderm inducers. *Nucleic. Acids. Res.* *26*, 5602-5608.
- Nieuwkoop,P.D. and Faber,J. (1975). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). (Amsterdam, The Netherlands: Elsevier/North-Holland Publishing Co).
- Novina,C.D. and Roy,A.L. (1996). Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet.* *12*, 351-355.
- Offield,M.F., Jetton,T.L., Labosky,P.A., Ray,M., Stein,R.W., Magnuson,M.A., Hogan,B.L., and Wright,C.V. (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* *122*, 983-995.
- Ogata,K., Sato,K., and Tahirov,T. (2003). Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: cooperativity from near and afar. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *13*, 40-48.
- Ohlsson,H., Karlsson,K., and Edlund,T. (1993). IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J.* *12*, 4251-4259.
- Olson,L.K., Sharma,A., Peshavaria,M., Wright,C.V., Towle,H.C., Rodertson,R.P., and Stein,R. (1995). Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 9127-9131.
- Orphanides,G., Lagrange,T., and Reinberg,D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* *10*, 2657-2683.
- Ovsenek,N., Zorn,A.M., and Krieg,P.A. (1992). A maternal factor, OZ-1, activates embryonic transcription of the *Xenopus laevis* GS17 gene. *Development* *115*, 649-655.
- Peers,B., Leonard,J., Sharma,S., Teitelman,G., and Montminy,M.R. (1994). Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Mol. Endocrinol.* *8*, 1798-1806.
- Peshavaria,M., Gamer,L., Henderson,E., Teitelman,G., Wright,C.V., and Stein,R. (1994). XIHbox 8, an endoderm-specific *Xenopus* homeodomain protein, is closely related to a mammalian insulin gene transcription factor. *Mol. Endocrinol.* *8*, 806-816.
- Pinkert,C.A., Ornitz,D.M., Brinster,R.L., and Palmiter,R.D. (1987). An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice. *Genes Dev.* *1*, 268-276.
- Pogge v.Strandmann,E., Nastos,A., Holewa,B., Senkel,S., Weber,H., and Ryffel,G.U. (1997). Patterning the expression of a tissue-specific transcription factor in embryogenesis: HNF1 alpha gene activation during *Xenopus* development. *Mech. Dev.* *64*, 7-17.

- Polli,M. and Amaya,E. (2002). A study of mesoderm patterning through the analysis of the regulation of Xmyf-5 expression. *Development* 129, 2917-2927.
- Qian,J., Kaytor,E.N., Towle,H.C., and Olson,L.K. (1999). Upstream stimulatory factor regulates Pdx-1 gene expression in differentiated pancreatic beta-cells. *Biochem. J.* 341 (Pt 2), 315-322.
- Rey-Campos,J., Chouard,T., Yaniv,M., and Cereghini,S. (1991). vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1. *EMBO J.* 10, 1445-1457.
- Ryffel,G.U. (2001). Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J. Mol. Endocrinol.* 27, 11-29.
- Ryffel,G.U. and Lingott,A. (2000). Distinct promoter elements mediate endodermal and mesodermal expression of the HNF1alpha promoter in transgenic *Xenopus*. *Mech. Dev.* 90, 65-75.
- Saltzman,A.G. and Weinmann,R. (1989). Promoter specificity and modulation of RNA polymerase II transcription. *FASEB J.* 3, 1723-1733.
- Samaras,S.E., Cissell,M.A., Gerrish,K., Wright,C.V., Gannon,M., and Stein,R. (2002). Conserved Sequences in a Tissue-Specific Regulatory Region of the pdx-1 Gene Mediate Transcription in Pancreatic beta Cells: Role for Hepatocyte Nuclear Factor 3beta and Pax6. *Mol. Cell Biol.* 22, 4702-4713.
- Samaras,S.E., Zhao,L., Means,A., Henderson,E., Matsuoka,T.A., and Stein,R. (2003). The islet beta cell-enriched RIPE3b1/Maf transcription factor regulates pdx-1 expression. *J. Biol. Chem.*
- Sambrock,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). Molecular cloning - a laboratory manual. (2nd edition) Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.
- Schiltz,J.F., Rustighi,A., Tessari,M.A., Liu,J., Braghetta,P., Sgarra,R., Stebel,M., Bressan,G.M., Altruda,F., Giancotti,V., Chada,K., and Manfioletti,G. (2003). Hmga2 promoter analysis in transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. Oct. 3;309. (4):718. -23. 309, 718-723.
- Schorpp,M., Dobbeling,U., Wagner,U., and Ryffel,G.U. (1988a). 5'-flanking and 5'-proximal exon regions of the two *Xenopus* albumin genes. Deletion analysis of constitutive promoter function. *J. Mol. Biol.* 199, 83-93.
- Schorpp,M., Kugler,W., Wagner,U., and Ryffel,G.U. (1988b). Hepatocyte-specific promoter element HP1 of the *Xenopus* albumin gene interacts with transcriptional factors of mammalian hepatocytes. *J. Mol. Biol.* 202, 307-320.
- Serup,P., Petersen,H.V., Pedersen,E.E., Edlund,H., Leonard,J., Petersen,J.S., Larsson,L.I., and Madsen,O.D. (1995). The homeodomain protein IPF-1/STF-1 is expressed in a subset of islet cells and promotes rat insulin 1 gene expression dependent on an intact E1 helix-loop-helix factor binding site. *Biochem. J.* 310 (Pt 3), 997-1003.

- Sharma,S., Leonard,J., Lee,S., Chapman,H.D., Leiter,E.H., and Montminy,M.R. (1996). Pancreatic islet expression of the homeobox factor STF-1 relies on an E-box motif that binds USF. *J. Biol. Chem.* 271, 2294-2299.
- Slack,J.M. (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development* 121, 1569-1580.
- Small,E.M. and Krieg,P.A. (2003). Transgenic analysis of the atrialnatriuretic factor (ANF) promoter: Nkx2-5 and GATA-4 binding sites are required for atrial specific expression of ANF. *Dev. Biol.* 2003. Sep. 1;261. (1):116. -31. 261, 116-131.
- Smith,A.F., Bigsby,R.M., Word,R.A., and Herring,B.P. (1998). A 310-bp minimal promoter mediates smooth muscle cell-specific expression of telokin. *Am. J. Physiol* 274, C1188-C1195.
- Sosa-Pineda,B., Chowdhury,K., Torres,M., Oliver,G., and Gruss,P. (1997). The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386, 399-402.
- Sparrow,D.B., Latinkic,B., and Mohun,T.J. (2000). A simplified method of generating transgenic Xenopus. *Nucleic Acids Res.* 28, E12.
- Stoffers,D.A., Heller,R.S., Miller,C.P., and Habener,J.F. (1999). Developmental expression of the homeodomain protein IDX-1 in mice transgenic for an IDX-1 promoter/lacZ transcriptional reporter. *Endocrinology* 140, 5374-5381.
- Stoffers,D.A., Zinkin,N.T., Stanojevic,V., Clarke,W.L., and Habener,J.F. (1997). Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat. Genet.* 15, 106-110.
- Tanaka,T., Kubota,M., Shinohara,K., Yasuda,K., and Kato,J.Y. (2003). In vivo analysis of the cyclin D1 promoter during early ebryogenesis in Xenopus. *Cell Struct. Funct.* 2003. Jun. ;28. (3):165. -77. 28, 165-177.
- Taunton,J., Hassig,C.A., and Schreiber,S.L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272, 408-411.
- Telgmann,R. and Gellersen,B. (1998). Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene. *Hum. Reprod. Update.* 4, 472-479.
- Tronche,F. and Yaniv,M. (1992). HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network. *Bioessays* 14, 579-587.
- Tsukiyama,T. and Wu,C. (1997). Chromatin remodeling and transcription. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 7, 182-191.
- Watada,H., Kajimoto,Y., Miyagawa,J., Hanafusa,T., Hamaguchi,K., Matsuoka,T., Yamamoto,K., Matsuzawa,Y., Kawamori,R., and Yamasaki,Y. (1996a). PDX-1 induces insulin and glucokinase gene expressions in alphaTC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin. *Diabetes* 45, 1826-1831.
- Watada,H., Kajimoto,Y., Umayahara,Y., Matsuoka,T., Kaneto,H., Fujitani,Y., Kamada,T., Kawamori,R., and Yamasaki,Y. (1996b). The human glucokinase gene beta-cell-type

promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells. *Diabetes* 45, 1478-1488.

Weber,H., Holewa,B., Jones,E.A., and Ryffel,G.U. (1996a). Mesoderm and endoderm differentiation in animal cap explants: identification of the HNF4-binding site as an activin A responsive element in the *Xenopus* HNF1alpha promoter. *Development* 122, 1975-1984.

Weber,H., Strandmann,E.P., Holewa,B., Bartkowski,S., Zapp,D., Zoidl,C., and Ryffel,G.U. (1996b). Regulation and function of the tissue-specific transcription factor HNF1 alpha (LFB1) during *Xenopus* development. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 297-304.

Wells,J.M. and Melton,D.A. (1999). Vertebrate endoderm development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 393-410.

Westley,B. and Weber,R. (1982). Divergence of the two albumins of *X. laevis*. Evidence for the glycosylation of the major 74K albumin. *Differentiation*. 22, 227-230.

Westley,B., Wyler,T., Ryffel,G., and Weber,R. (1981). *Xenopus laevis* serum albumins are encoded in two closely related genes. *Nucleic. Acids. Res.* 9, 3557-3574.

Winter,W.E., Nakamura,M., and House,D.V. (1999). Monogenic diabetes mellitus in youth. The MODY syndromes. *Endocrinol. Metab Clin. North Am.* 28, 765-785.

Winter,W.E. and Silverstein,J.H. (2000). Molecular and genetic bases for maturity onset diabetes of youth. *Curr. Opin. Pediatr.* 12, 388-393.

Wright,C.V., Schnegelsberg,P., and De Robertis,E.M. (1989). XlHbox 8: a novel *Xenopus* homeo protein restricted to a narrow band of endoderm. *Development* 105, 787-794.

Wu,K.L., Gannon,M., Peshavaria,M., Offield,M.F., Henderson,E., Ray,M., Marks,A., Gamer,L.W., Wright,C.E., and Stein,R. (1997). Hepatocyte nuclear factor 3 beta is involved in pancreatic beta-cell-specific transcription of the *pdx-1* gene. *Mol. Cell Biol.* 17, 6002-6013.

Yakar,S., Liu,J.L., Stannard,B., Butler,A., Accili,D., Sauer,B., and LeRoith,D. (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 7324-7329.

Yasuda,G.K. and Schubiger,G. (1992). Temporal regulation in the early embryo: is MBT too good to be true? *Trends Genet.* 8, 124-127.

Yoshiuchi,I., Yamagata,K., Yang,Q., Iwahashi,H., Okita,K., Yamamoto,K., Oue,T., Imagawa,A., Hamaguchi,T., Yamasaki,T., Horikawa,Y., Satoh,T., Nakajima,H., Miyazaki,J., Higashiyama,S., Miyagawa,J., Namba,M., Hanafusa,T., and Matsuzawa,Y. (1999). Three new mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in Japanese subjects with diabetes mellitus: clinical features and functional characterization. *Diabetologia* 42, 621-626.

Zapp,D., Bartkowski,S., Holewa,B., Zoidl,C., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (1993a). Elements and factors involved in tissue-specific and embryonic expression of the liver transcription factor LFB1 in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* 13, 6416-6426.

Zapp,D., Bartkowski,S., Zoidl,C., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (1993b). Genomic structure of the *Xenopus laevis* liver transcription factor LFB1. *Gene* 134, 251-256.

Zaret,K.S. (2000). Liver specification and early morphogenesis. *Mech. Dev.* 92, 83-88.

Zernicka-Goetz,M., Pines,J., Ryan,K., Siemering,K.R., Haseloff,J., Evans,M.J., and Gurdon,J.B. (1996). An indelible lineage marker for *Xenopus* using a mutated green fluorescent protein. *Development* 122, 3719-3724.

Zhou,D., Zhou,C., and Chen,S. (1997). Gene regulation studies of aromatase expression in breast cancer and adipose stromal cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 61, 273-280.

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor von Prof. Dr. G. U. Ryffel am Institut für Zellbiologie der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt.

Ich danke Prof. Dr. Ryffel für die Überlassung des interessanten Themas, seine zahlreichen Anregungen zum Fortgang der Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Gülüzar Turan danke ich für die Unterstützung bei den Zellkulturexperimenten.

Frau Daniela Plitzko danke ich für die Hilfe bei der Herstellung transgener Xenopoden.

Bei den Herren Jüde, Gossens, Nickol möchte ich mich für gute Betreuung der Frösche bedanken.

Frau Dr. Heike Thomas danke ich für die stete Hilfsbereitschaft bei fachlichen Fragen.

Danken möchte ich auch Silvia Bohn und Sabine Senkel für viele interessante und lustige Gespräche.

Außerdem danke ich Silke Erdmann, Belen Lucas, Tanja Arndt und allen übrigen Mitgliedern der AG III die hier nicht namentlich erwähnt wurden für die kollegiale Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima.

Danken möchte ich auch meinem Bruder Raphael für die gemeinsamen Fahrten und meinen Eltern ohne die ich nicht wäre was ich bin.

Mein ganz besonderer Dank gilt Katja Vinbruck, die mir jederzeit Rückhalt und Motivation zugleich war.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Identifizierung der Regulationselemente gewebespezifisch exprimierter Gene in transgenen Xenopoden“, zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Kenneth Simon befürworte.

Essen, d. 08.10.2003

Prof. Dr. G. U. Ryffel

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, d. 08.10.2003

Kenneth Simon

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, d.08.10.2003

Kenneth Simon